

Université de Montréal

La glycine décarboxylase désensibilise les cellules initiatrices de tumeur à la metformine

par

Karine Moineau-Vallée

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise en biochimie,
option cheminement libre

Juillet, 2015

© Karine Moineau-Vallée, 2015

Résumé

Le cancer du pancréas est l'un des plus chimiorésistants, avec un taux de survie sur 5 ans inférieur à 5%. La chimiorésistance pourrait être due à la présence de cellules initiatrices de tumeur (TICs), une petite sous-population des cellules tumorales possédant la capacité de régénérer une nouvelle tumeur. Il a été démontré que la metformine cible les TICs par un mécanisme non élucidé. Il est connu que la metformine affecte le métabolisme du carbone. Il a également été démontré que le métabolisme du carbone, plus précisément la glycine décarboxylase (GLDC), est à la fois nécessaire et suffisant à l'acquisition de propriétés d'initiation tumorale. Nous proposons que la metformine cible les cellules initiatrices de tumeur en affectant le métabolisme du carbone.

Nous avons utilisé des lignées cellulaires dérivées d'un modèle murin de cancer du pancréas pour comparer l'expression génique de lésions bénignes versus malignes. Les cellules malignes surexpriment Glc. La metformine diminue l'expression de Glc, et la surexpression de Glc diminue la sensibilité à la metformine dans un essai de sphères tumorales. La metformine induit une augmentation du ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, et la surexpression de Glc empêche cette augmentation.

Nous proposons que la metformine diminue l'expression de Glc, ce qui cause une diminution du flux du métabolisme du carbone, et donc une diminution de la production de NADPH par ce dernier. L'augmentation du ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ inhibe la synthèse des acides gras et la régénération de la glutathione, ce qui pourrait expliquer la diminution de la formation de sphères tumorales sous traitement metformine.

Mots-clés : cancer du pancréas, cellules initiatrices de tumeur, glycine décarboxylase, métabolisme du cancer, métabolisme du carbone, metformine, NADPH.

Abstract

Pancreatic cancer is one of the most chemoresistant cancers, with a 5-year survival rate lesser than 5%. Chemoresistance might be due to the presence of tumor-initiating cells (TICs), a small subpopulation of tumor cells with stem-like characteristics which possess the unique ability to self-renew and to generate a new tumor. Metformin has been shown to affect TICs in various cancer types, but the mechanism through which it does so is unclear. It is known that metformin affects one-carbon metabolism. It has also been shown that one-carbon metabolism, more precisely the glycine decarboxylase (GLDC) enzyme, is both necessary and sufficient to the acquisition of tumor-initiating properties. Considering this, we propose that metformin affects TICs by targeting one-carbon metabolism.

Using cell lines derived from a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer, we compared gene expression data from cells derived from benign pancreatic neoplasia with cells derived from pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), and found that PDAC cells exhibited a dramatic increase in Gldc expression. Metformin treatment decreases Gldc expression in PDAC cell lines, and Gldc overexpression greatly decreases metformin sensitivity in a tumor sphere assay. Metformin induces an increase in $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio, which is rescued by Gldc overexpression.

We propose a model in which metformin decreases Gldc expression, which causes reduced flux through mitochondrial one-carbon metabolism. This results in decreased NADPH production by this pathway. This increase in $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio impairs fatty acid biosynthesis and glutathione regeneration. Together these effects might explain the decrease of tumor sphere formation under metformin treatment.

Keywords : cancer metabolism, glycine decarboxylase, metformin, NADPH, one-carbon metabolism, pancreatic cancer, tumor-initiating cells.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles.....	viii
Remerciements.....	xi

INTRODUCTION	1
Les cellules initiatrices de tumeur.....	1
Le cancer du pancréas.....	1
Initiation et progression du cancer du pancréas.....	1
La conception du cancer : modèle stochastique versus hiérarchique.....	3
Techniques pour identifier et/ou quantifier les cellules initiatrices de tumeur.....	4
Essai de sphères tumorales.....	4
FACS.....	5
Essai de dilution limitante par xénogreffe.....	5
Particularités métaboliques des cellules initiatrices de tumeur.....	6
Médicaments ciblant les cellules initiatrices de tumeur.....	6
Metformine	7
Cible(s) de la metformine.....	7
Inhibition du complexe I.....	7
Activation de l'AMP kinase.....	8
Effets indépendants de l'AMPK.....	8
Effet sur le métabolisme du carbone.....	9
La metformine contre le cancer.....	12
La metformine cible les cellules initiatrices de tumeur.....	12
Le métabolisme du carbone.....	13
Extrants du métabolisme du carbone.....	16

Unités carbone.....	16
NADPH.....	17
Rôle du NADPH (vs NADH)	19
Interconversion NADH→NADPH.....	21
Autres sources de NADPH.....	21
Compartimentalisation du métabolisme du carbone.....	22
Le métabolisme du carbone dans le cancer.....	27
Le NADPH et le cancer.....	27
Le métabolisme du carbone dans les cellules initiatrices de tumeur : le cas de la glycine décarboxylase.....	28
Hypothèses et objectifs.....	29
Contribution de l'étudiante.....	30
ARTICLE: Glycine decarboxylase reduces metformin sensitivity of tumor-initiating cells	31
Abstract.....	32
Significance statement	32
Introduction.....	33
Results.....	34
Discussion.....	37
Glycine accumulation-induced toxicity.....	37
Increase of NAD ⁺ /NADH ratio under metformin treatment.....	37
Metformin and NADPH, a new relationship.....	38
Regulation of GLDC mRNA levels by metformin.....	39
Materials and methods.....	40
Plasmids and reagents	40
Cell culture and retroviral-mediated gene transfer.....	40
Microarray gene expression analysis.....	41
Western blot	41
Real time quantitative PCR	41

NAD(P)t and NAD(P)H quantification.....	41
Tumor sphere assay.....	41
Statistics.....	42
Acknowledgements.....	42
References.....	43
Figures and legends.....	47
Supplementary information.....	52
 DISCUSSION.....	 55
La metformine et les cellules initiatrices de tumeur.....	55
Différence dans la sensibilité à la metformine des cellules NB508 vs AH375.....	55
Importance de l'accumulation de glycine.....	56
Importance du NADPH dans la sensibilité à la metformine.....	57
Importance du NADPH pour les cellules cancéreuses.....	58
Régulation de la production de NADPH par p53.....	58
Régulation transcriptionnelle de Glc6p par la metformine.....	59
Régulation des niveaux protéiques de Glc6p et de son activité enzymatique par la metformine.....	60
GLC6p, hypoxie et metformine.....	60
 Perspectives.....	 62
Conclusion	63
Bibliographie.....	64

Liste des tableaux

INTRODUCTION

Tableau I. Extrants du métabolisme du carbone selon leur provenance.....18

Tableau II. Comparaison entre NADPH et NADH.....20

ARTICLE

Supplementary Table I. List of genes found in microarray.....54

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1. Schéma de la progression du cancer du pancréas.....	2
Figure 2. Cibles possibles de la metformine.	10
Figure 3. Métabolisme du carbone.....	15
Figure 4. Compartimentalisation du métabolisme du carbone.	25
Figure 5. Navettes de NADPH.....	26

ARTICLE

Figure 1. Glycine decarboxylase is overexpressed in PDAC cells compared to PanIN.	47
Figure 2. Metformin treatment reduces tumor sphere formation and glycine decarboxylase mRNA levels.	48
Figure 3. Glycine decarboxylase overexpression reduces metformin sensitivity.	49
Figure 4. Glycine decarboxylase overexpression restores NADPH levels but not NADH levels under metformin treatment.	50
Figure 5. Schematic of the current working model.	51
Figure S1. Carbon units supplementation does not recapitulate metformin desensitization as observed in Gldc-overexpressing cells.	52
Figure S2. Metformin sensitivity isn't due to glycine accumulation.	53

Liste des sigles

ACC : acétyl-CoA carboxylase
ADM : métaplasie acinaire à ductale
AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide
ALDH : aldéhyde déshydrogénase
AMP : adénosine monophosphate
AMPK : kinase activée par l'AMP
ATP : adénosine triphosphate
dTMP : déoxythymidine monophosphate
dUMP : déoxyuridine monophosphate
ER : récepteur à œstrogène
ESA : antigène spécifique à l'épithélium
FACS : cytométrie en flux
FAICAR : N-formylaminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide
FGAR : formylglycinamide ribonucléotide
G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAR : glycinamide ribonucléotide
GLDC : glycine décarboxylase
GMP : guanosine monophosphate
GSSG : glutathione oxydée
Hcy : homocystéine
IDH1 : isocitrate déshydrogénase 1
IDH2 : isocitrate déshydrogénase 2
IKK α/β : I κ B kinase α/β
IL-6 : interleukine 6
I κ B α : inhibiteur de κ B alpha
MAT : méthionine adénosyltransférase
ME1: enzyme malique 1
ME2: enzyme malique 2
ME3: enzyme malique 3

Met : méthionine

MS : méthionine synthase

MTHFD1 : méthylène-THF déshydrogénase 1

MTHFD1L : méthylène-THF déshydrogénase 1-*like*

MTHFD2 : méthylène-THF déshydrogénase 2

MTHFD2L : méthylène-THF déshydrogénase 2-*like*

MTHFR : méthylène-THF réductase

mTORC1 : complexe mammifère de TOR (*target of rapamycin*) 1.

NAD(H) : nicotinamide adénine dinucléotide

NADP(H) : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF- κ B : facteur nucléaire kappa-B

PanIN : lésion intraépithéliale préinvasive

PDAC : adénocarcinome pancréatique ductal

PGC-1 α : PPAR γ coactivateur-1 α

SAH : S-adénosyl-(L)-homocystéine

SAM : S-adénosyl-(L)-méthionine

SHMT1/2 : sérine hydroxyméthyltransférase 1/2

Src : non récepteur tyrosine kinase Src

SREBP-1: protéine liant les éléments de réponse au stérol (SRE) 1

THF : tétrahydrofolate

TIC : cellule initiatrice de tumeur

TorC2 : coactivateur de la transcription régulé par CREB 2

voie PP: voie pentose phosphate

Pour Dédé et Quiquine

Remerciements

Je tiens à remercier Gerardo, sans qui cela n'aurait pas été possible. Et mes parents et amis pour m'avoir épaulée à travers les moments les plus difficiles.

Je remercie également la Faculté des Études Supérieures (FESP) de l'Université de Montréal, le Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie de Canada (CRSNG) pour leur soutien financier sous forme de bourses d'études et de recherche.

Introduction

Les cellules initiatrices de tumeur

Le cancer du pancréas

Le cancer du pancréas représente 3% de tous les nouveaux cas de cancer, mais 7% des morts liées au cancer (1). Il est l'un des cancers les plus mortels, avec un taux de survie de moins de 5% sur 5 ans (2, 3). Ce faible taux de survie est partiellement dû au fait que le diagnostic est souvent tardif. En effet, seulement 20% des patients diagnostiqués sont éligibles à la chirurgie, le cancer ayant déjà métastasé dans les autres cas (4). Ceci, combiné au fait qu'il n'existe actuellement aucune chimiothérapie efficace contre ce cancer lorsque la chirurgie n'est pas possible (4), explique le taux de survie désolant observé. Pour cette raison, il est crucial d'étudier le cancer du pancréas, afin de mieux le comprendre et de développer des chimiothérapies capables de l'éliminer.

Initiation et progression du cancer du pancréas

Le pancréas est composé de cellules acinaires et ductales, les cellules acinaires sécrétant les enzymes digestives et les cellules ductales formant les canaux transportant ces enzymes vers l'intestin grêle. Le cancer du pancréas débute habituellement dans les cellules acinaires, souvent par une mutation activatrice de l'oncogène *KRAS* (5). K-Ras est muté dans plus de 90% des cancers pancréatiques (6) et environ 30% de tous les cancers (7). Cette mutation induit une transdifférenciation des cellules acinaires en cellules ductales, un processus appelé métaplasie acinaire à ductale (ADM). Ces cellules progressent ensuite à travers différentes phases de lésions intraépithéliales préinvasives (PanIN1-3; figure 1, p.2), suivant la perte de différents suppresseurs de tumeur comme p16^{INK4a} et p53, avant d'éventuellement évoluer en adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC) (6, 8, 9).

Des lésions de type PanIN1-2 sont retrouvées chez la majorité des adultes de plus de 40 ans et ne sont pas nécessairement associées au développement d'un cancer. Par contre, la présence de lésions de type PanIN3 est presque inévitablement associée au développement subséquent d'un PDAC (8).

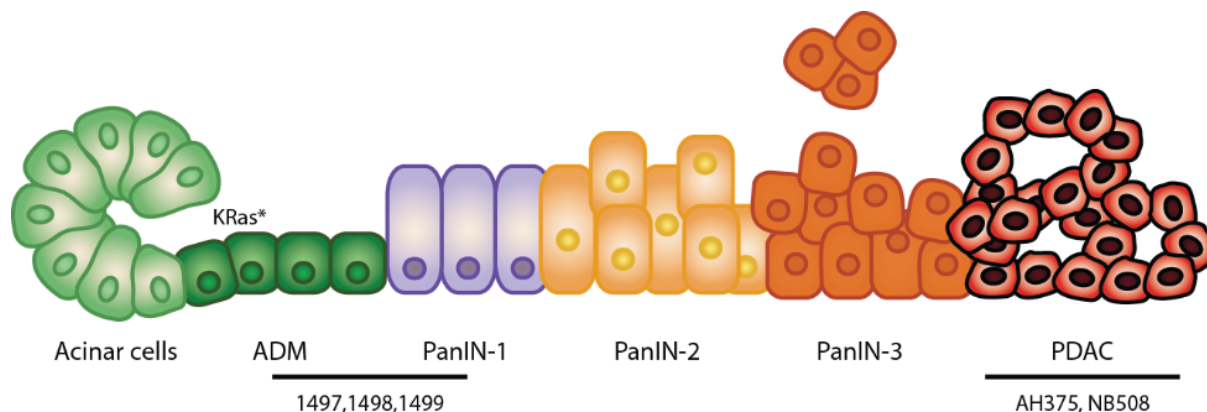


Figure 1. **Schéma de la progression du cancer du pancréas.**

Le cancer pancréatique se déclare le plus souvent à partir de cellules acinaires, qui subissent une reprogrammation de leur identité vers une identité de cellule ductale. On appelle cette transition ADM (métaplasie acinaire à ductale). Les lésions ADM peuvent ensuite progresser à travers trois stades de lésions intraépithéliales préinvasives (PanIN1-3) de plus en plus transformées, jusqu'à atteindre le stade d'adénocarcinome pancréatique (PDAC).

Des lignées cellulaires ont été établies à partir de souris $\text{Pdx1-Cre;LSL-KRas}^{\text{G12D}}$ présentant des lésions de type ADM-PanIN1 (lignées 1497, 1498, 1499) ou des cancers pancréatiques (lignée AH375). La lignée NB508 a été établie à partir d'un cancer pancréatique de souris $\text{Pdx1-Cre;LSL-Kras}^{\text{G12D}};\text{p53}^{\text{Lox/+}};\text{p16}^{+/-}$.

Figure reproduite avec l'autorisation de Xavier Deschênes-Simard.

La conception du cancer : modèle stochastique versus hiérarchique

La conception du cancer a beaucoup évolué au cours des dernières années. Le modèle classique du cancer, dit stochastique, propose que la majorité des cellules de la tumeur sont capables de générer une nouvelle tumeur. Selon ce modèle, puisque toutes les cellules de la tumeur ont des probabilités environ égales de générer une nouvelle tumeur, le but de la chimiothérapie doit être d'éliminer l'ensemble de la tumeur. Le succès thérapeutique est alors mesuré à la réduction de la taille de la tumeur. Malheureusement, les thérapies anticancéreuses développées selon cette conception du cancer, bien qu'ayant eu du succès dans certains cas, ont connu des échecs fracassants contre les cancers particulièrement malins, comme le glioblastome et le PDAC (2, 10). Elles se révèlent aussi fréquemment incapables de prévenir les rechutes thérapeutiques, c'est-à-dire la récurrence du cancer suite à l'arrêt du traitement. Ces insuffisances suggèrent que cette conception du cancer est peut-être incomplète, et qu'il sera nécessaire de réfléchir autrement si l'on souhaite développer des thérapies anticancer plus efficaces et entraînant moins de rechutes.

C'est là où le modèle hiérarchique du cancer entre en jeu. Il y a une vingtaine d'années, il a été découvert que, dans les leucémies, seule une petite fraction des cellules leucémiques possédaient la capacité de générer à elles seules une nouvelle tumeur (11). Ces cellules ont été dénommées « cellules souches cancéreuses », ou « cellules initiatrices de tumeur » (TICs). Elles ont par la suite été identifiées dans une variété de cancers solides, dont le cancer du cerveau, du poumon, du sein et du pancréas (12-22). Les TICs ont des caractéristiques similaires à celles des cellules souches. En effet, elles expriment des facteurs de transcription associés à la pluripotence, ont une résistance accrue à l'apoptose, aux dommages à l'ADN et au stress oxydatif, ont la capacité d'entrer en quiescence et expriment parfois des transporteurs ABC (12-15, 17, 21, 23-25). De plus, elles seraient capables de s'auto-renouveler ainsi que d'engendrer des cellules filles plus différenciées mais se divisant plus rapidement, qui elles formeraient le gros de la tumeur (17). Considérant que la chimiothérapie traditionnelle cible essentiellement les cellules se divisant rapidement, et ce, souvent en leur infligeant des dommages à l'ADN, il devient vite évident que les TICs sont beaucoup moins sensibles à la chimiothérapie que le reste des cellules de la tumeur (23). Il a d'ailleurs été démontré que, suite à un traitement de chimiothérapie induisant une réduction de la taille de la tumeur, les cellules cancéreuses qui

restent sont fortement enrichies en TICs (26-28), ce qui explique les rechutes thérapeutiques fréquemment observées après l'arrêt du traitement. Il devient donc crucial de développer des thérapies ciblant spécifiquement les TICs. Ces thérapies pourraient être utilisées en combinaison à des thérapies traditionnelles, afin de diminuer à la fois la taille de la tumeur et sa probabilité de récurrence.

Techniques pour identifier et/ou quantifier les cellules initiatrices de tumeur

Le développement de thérapies ciblant les TICs nécessite des techniques permettant de quantifier celles-ci dans différentes conditions, afin de mesurer l'efficacité des thérapies proposées. Il existe plusieurs techniques possibles, chacune présentant divers avantages et inconvénients.

Essai de sphères tumorales

L'essai de sphères tumorales est basé sur l'essai de neurosphères, qui a été développé il y a environ vingt ans (29). Cet essai consiste à faire croître les cellules dans un puits traité pour la non-adhérence, dans un milieu enrichi en facteurs de croissance. Les cellules souches totipotentes et les cellules progénitrices pluripotentes sont capables de proliférer en 3D et chacune d'elle va former une sphère (29-32). L'essai est donc clonal et permet de quantifier la proportion de cellules à caractère souche présentes dans la population. Les cellules non pluripotentes vont survivre dans ces conditions de culture mais ne proliféreront pas ou très peu et ne formeront pas de sphères (29-32).

L'avantage de cet essai est qu'il se base sur la propriété intrinsèque des cellules à caractère souche de former des sphères, et ne nécessite donc pas l'utilisation d'un marqueur moléculaire spécifique pour la quantification, comparativement au FACS. L'essai de sphères tumorales est également relativement rapide (7 à 14 jours). Par contre, l'un des désavantages est qu'il peut surestimer la proportion de TICs, puisque les cellules souches comme les cellules progénitrices précoces, qui possèdent toutes deux un caractère souche, sont capables de former des sphères (29). Une autre limitation de cet essai sont que les cellules pluripotentes « dormantes » (quiescentes) ne formeront probablement pas de sphères même si elles sont techniquement pluripotentes (29). Aussi, cela reste un essai *in vitro* qui ne récapitule pas toute la complexité de l'initiation tumorale *in vivo*.

FACS

Une autre technique couramment utilisée pour quantifier et trier les TICs est le FACS (cytométrie en flux). Le FACS permet de trier les cellules selon leur reconnaissance ou non par un anticorps contre une protéine donnée, ainsi que par leur efflux ou non de certains colorants (par exemple celui de Hoescht, caractéristiquement effluxé des cellules exprimant des transporteurs ABC (33)). L'avantage du FACS est qu'il permet de séparer des populations de cellules vivantes pour des expériences subséquentes, à condition d'utiliser pour le tri des marqueurs ne nécessitant pas de perméabilisation. Par contre, le désavantage principal est que la qualité des données obtenues par FACS dépend de l'existence d'un marqueur fiable et validé des TICs dans le cancer étudié. La validité des marqueurs doit être testée, habituellement par essai de dilution limitante par xénogreffe (discuté ci-après), afin de valider qu'il y a effectivement enrichissement du potentiel d'initiation tumoral suite au tri.

Bien que simple en théorie, l'utilisation du FACS dans le champ d'étude des TICs est une technique controversée, principalement parce que les marqueurs utilisés varient d'une étude à l'autre, même au sein d'un même cancer. Dans le cancer du pancréas, les marqueurs proposés sont très variés et aucun n'a été clairement reproduit par plusieurs groupes indépendants. Les marqueurs proposés comprennent CD133 (4), ALDH (34), les cellules non marquées par le colorant d'exclusion de Hoechst (4), la combinaison $CD44^+CD24^+ESA^+$ (4) et l'auto-fluorescence liée à l'accumulation de vésicules contenant de la riboflavine (35). Dû à la multitude de marqueurs à la fiabilité non avérée, nous avons choisi dans ce projet d'utiliser plutôt l'essai de sphères tumorales comme technique *in vitro* pour évaluer la quantité de TICs.

Essai de dilution limitante par xénogreffe

La troisième technique couramment utilisée pour la quantification de TICs est l'essai de dilution limitante par xénogreffe. Cet essai consiste à injecter en sous-cutané dans des souris différentes quantités de cellules cancéreuses et d'estimer ainsi la quantité minimale de cellules à injecter afin d'obtenir la formation d'une tumeur. Cette quantité minimale révèle la fréquence des TICs dans la population. Par exemple, si l'injection d'au moins 1000 cellules est nécessaire à l'initiation tumorale, cela implique que la fréquence des TICs est d'environ 1:1000. Cette technique est celle qui, parmi les trois présentées ici, s'approche le plus de la réalité *in vivo* de

l'initiation de la formation de tumeur, du moins pour les lignées cellulaires de souris, qui n'ont pas les mêmes difficultés d'implantation que les lignées humaines dans les essais de xénogreffe. En effet, il a été démontré que, du moins pour certaines lignées de mélanomes humains, l'utilisation de souris davantage immunodéprimées améliorerait l'efficacité d'initiation tumorale de plusieurs ordres de grandeur (36). Du coup, il est important d'être conscient que cette technique peut sous-estimer dramatiquement la fréquence de cellules initiatrices de tumeurs lors de l'utilisation de lignées cancéreuses humaines.

Particularités métaboliques des cellules initiatrices de tumeur

Dans les dernières années, plusieurs études se sont penchées sur le métabolisme des TICs afin d'en élucider les particularités, en espérant que ces données pourraient révéler des faiblesses métaboliques exploitables au niveau thérapeutique. Il a été démontré que les TICs de carcinome du nasopharynx ont un métabolisme plus glycolytique que les cellules cancéreuses non différenciées, mais possèdent davantage de mitochondries (37). Celles-ci seraient utilisées à des fins anaboliques plutôt que pour la phosphorylation oxydative. De plus, il semblerait que les TICs possèdent la capacité de remodeler leur métabolisme vers un métabolisme centré sur la phosphorylation oxydative, et que cette capacité serait cruciale à leur résistance au stress métabolique (38). Par contre, toutes les TICs ne présentent pas les mêmes caractéristiques métaboliques. En effet, il a été démontré que les TICs de gliome sont moins glycolytiques que leurs homologues différenciées. Dans cette étude, les TICs consomment moins de glucose et produisent moins de lactate, tout en ayant une capacité de réserve mitochondriale supérieure (39).

Médicaments ciblant les cellules initiatrices de tumeur

Depuis l'émergence de l'hypothèse des cellules initiatrices de tumeur, un grand intérêt a été porté au développement de drogues capables de cibler spécifiquement ces cellules (12, 15, 20, 21, 40, 41). Une des approches préconise de cibler les marqueurs de surface spécifiques aux TICs (41). Une autre approche prometteuse vise à inhiber les transporteurs ABC, qui seraient en partie responsables de la chimiorésistance des TICs, en combinaison avec un traitement de chimiothérapie traditionnelle comme la doxorubicine (42).

Parallèlement à ces approches ciblées, un médicament déjà commercialisé et largement utilisé, la metformine, a été démontrée comme ciblant les TICs (43-46). Par contre, contrairement aux drogues développées afin de cibler un aspect particulier de la biologie des TICs, le mécanisme par lequel la metformine agit sur ces cellules est inconnu. Considérant que la capacité des TICs à effectuer la phosphorylation oxydative lors d'un stress métabolique est importante à leur survie (38), il est possible que la metformine cible les TICs en bloquant cette voie d'adaptation métabolique, rendant ces cellules plus vulnérables au stress induit par d'autres thérapies.

Metformine

La metformine est un biguanide qui est utilisé depuis plusieurs décennies dans le traitement du diabète de type II. Elle est principalement absorbée dans le foie, par des cellules exprimant les transporteurs de cations organiques 1 et 3 (OCT1/3), puisque de par son caractère hydrophile elle ne peut pas traverser efficacement les membranes cellulaires (47, 48). OCT1 est fortement exprimé dans les hépatocytes et par certaines cellules transformées, et plus faiblement par plusieurs tissus comme les îlots de Langerhans (48). La metformine présente peu d'effets secondaires, excepté un faible risque d'acidose lactique – beaucoup plus faible que pour d'autres biguanides comme la phenformine et la buformine (49, 50).

Cibles de la metformine

Inhibition du complexe I

La cible d'action directe de la metformine demeure controversée (47, 49, 51-53). L'hypothèse la plus répandue propose que la metformine inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (54-57). Par contre, le mécanisme par lequel la metformine inhibe le complexe I n'est pas complètement élucidé. Il a été démontré que la metformine diminue la consommation d'oxygène de mitochondries isolées ou de cellules intactes (47), et favorise la glycolyse, ce qui se traduit par une augmentation de la production de lactate (58). Il a également été démontré que la metformine pouvait inhiber de manière non compétitive un complexe I purifié (59). Cette inhibition directe du complexe I par la metformine a toutefois été mesurée à des concentrations millimolaires, ce qui laisse planer un doute sur la pertinence de ces

observations dans le contexte des patients (dose maximale de $\sim 10 \mu\text{M}$ observée dans le sérum) et entretient la controverse par rapport à la cible d'action réelle de la metformine (49). Il est toutefois important de noter que, puisque la metformine, comme tous les biguanides, possède la capacité de s'accumuler dans les membranes mitochondriales (47), la concentration atteinte par la metformine dans les mitochondries des patients traités à long terme pourrait s'approcher des doses utilisées en laboratoire pour tester l'inhibition du complexe I ainsi que d'autres effets de la metformine.

Activation de l'AMP kinase

L'inhibition du complexe I par la metformine cause une augmentation du ratio AMP/ATP, ce qui active l'AMPK (kinase activée par l'AMP). Celle-ci est souvent considérée comme l'effecteur principal (mais indirect) de la metformine. L'AMPK phosphoryle de nombreuses cibles, dont TorC2, un activateur de la transcription des gènes impliqués dans la gluconéogenèse, c'est-à-dire la production de glucose à partir de divers substrats (pyruvate, lactate, glycérol ou certains acides aminés) dans les hépatocytes. Cette phosphorylation bloque la translocation de TorC2 au noyau et supprime l'expression de ses gènes cibles (49). Ceci pourrait causer la baisse des niveaux de glucose et d'insuline observée chez les patients diabétiques traités à la metformine (49).

Effets indépendants de l'AMPK

Il est maintenant connu que plusieurs effets de la metformine sont AMPK-indépendants. En effet, il a été démontré que la présence d'une AMPK fonctionnelle n'est pas nécessaire à l'effet anti-hyperglycémique de la drogue (47). La diminution du glucose sanguin chez les diabétiques traités à la metformine dépendrait plutôt de la diminution de la production d'ATP, conséquence de l'inhibition du complexe I. Cette diminution d'ATP inhiberait la fructose-1,6-bisphosphatase, une enzyme essentielle à la gluconéogenèse (47).

Il a également été démontré que la metformine inhibe la phosphorylation de $\text{IKK}\alpha/\beta$ (IkB kinase α/β), empêchant ainsi son activation et donc l'activation subséquente du facteur de transcription NF- κB , diminuant ainsi la transcription de ses gènes pro-inflammatoires comme IL-6 (44, 60). Cet effet est indépendant d'AMPK puisqu'il se produit même dans des fibroblastes embryonnaires de souris $\text{AMPK}^{-/-}$ (60).

Il a aussi été démontré que la metformine diminue la synthèse des acides gras (61-64). Cet effet dépend de l'activation de PGC-1 α (PPAR γ coactivateur-1 α), qui peut être ou non AMPK-dépendante (65-67), et de l'inhibition de SREBP-1 (protéine liant les éléments de réponse au stérol (SRE) 1) et de l'acétyl-CoA carboxylase par AMPK (61).

Effet sur le métabolisme du carbone

Il est aussi connu que la metformine induit, chez les patients diabétiques traités à long terme avec cette drogue, une augmentation des niveaux d'homocystéine dans le sérum et une diminution de l'absorption de vitamine B12 (68). Quelques données semblent montrer également une déplétion du folate (69). Cela suggère que la metformine pourrait avoir un effet sur le métabolisme du carbone. En effet, les niveaux d'homocystéine dans le sérum sont dépendants de plusieurs enzymes clés du métabolisme du carbone, comme MTHFR (méthylène-tétrahydrofolate réductase), MS (méthionine synthase), ainsi que des niveaux de folate et de vitamine B12 (70). Du coup, un débalancement du métabolisme du carbone se reflète généralement sur les niveaux d'homocystéine circulante. En effet, un polymorphisme moins actif de la MTHFR ou de la MS cause une augmentation de l'homocystéine circulante (70). Il existe une autre voie capable de remétyler l'homocystéine en méthionine, et ce, par le transfert à l'homocystéine d'une unité carbone provenant de la bétaine. Par contre, cette voie alternative n'existe que dans les cellules hépatiques. Dans les autres tissus, comme le pancréas, la reméthylation de l'homocystéine ne peut se faire que par le cycle du folate (70). L'ensemble de ces données suggère donc que la metformine pourrait agir sur le métabolisme du carbone. Par contre, le mécanisme par lequel la metformine exercerait cet effet n'est pas connu.

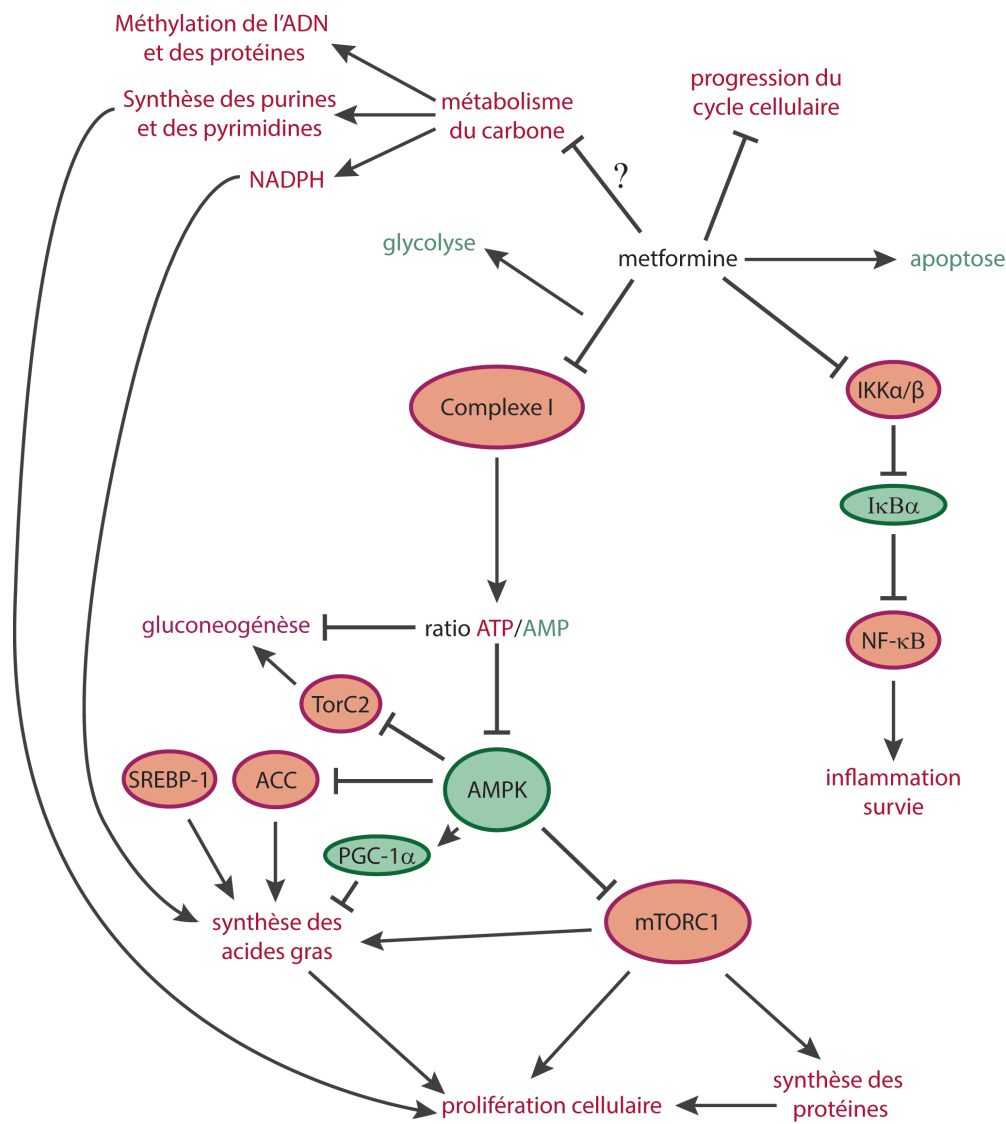


Figure 2. Cibles possibles de la metformine.

La metformine inhibe le complexe I, causant une activation compensatoire de la glycolyse. Les cellules incapables d'effectuer ce remodelage métabolique entrent en apoptose. L'inhibition du complexe I cause une diminution du ratio ATP:AMP, ce qui induit l'activation d'AMPK. AMPK pousse la cellule en mode de conservation d'énergie, et ce, entres autres, en inhibant mTORC1 et donc la production de protéines et d'acides gras, et donc la prolifération cellulaire. La metformine inhibe également la voie NF-κB, en bloquant l'activation de la kinase IKKα/β, qui phosphoryle l'inhibiteur de NF-κB, IκBα, libérant ainsi NF-κB du cytoplasme et lui permettant de transloquer au noyau, où il induit la transcription de gènes inflammatoires (60).

La metformine affecterait aussi potentiellement le métabolisme du carbone, par un mécanisme encore inconnu.

Les éléments activés par la metformine sont indiqués en vert, et ceux inhibés par la metformine sont indiqués en rouge.

ACC: acetyl-CoA carboxylase; AMP: adenosine monophosphate; AMPK: kinase activée par l'AMP; ATP: adenosine triphosphate; I κ B α : inhibiteur de κ B alpha; IKK α/β : I κ B kinase α/β ; mTORC1: complexe mammifère de TOR (cible de la rapamycine) 1; NF- κ B: facteur nucléaire kappa-B; PGC1- α : PPAR γ coactivateur-1 α ; SREBP1: protéine liant les éléments de réponse au stérol (SRE) 1; TorC2: coactivateur de la transcription régulé par CREB 2.

La metformine contre le cancer

Récemment, plusieurs études ont montré que les patients diabétiques souffrant de cancer avaient de meilleurs pronostics lorsqu'ils étaient traités à la metformine, entre autres dans le cancer du pancréas (71-73). Cet effet n'a toutefois pas été observé dans toutes les études (74). Ces données ont causé un vif intérêt dans la communauté scientifique, qui cherche maintenant à d'élucider les bases moléculaires de l'action anticancéreuse de la metformine.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme d'action anticancer de la metformine. Le paradigme veut que la metformine agisse en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui active indirectement l'AMPK. AMPK pousse la cellule en mode conservation d'énergie, et ce, entre autres, en inhibant mTORC1 et donc la production de protéines et d'acides gras, et donc la croissance et la prolifération cellulaires (47, 53, 67, 75-78). Ceci implique un mécanisme d'action plutôt cytostatique que cytotoxique.

En fait, il a été suggéré que non seulement l'effet anticancer de la metformine pourrait être AMPK-indépendant, mais qu'en plus l'activation de l'AMPK pourrait venir contrecarrer les effets antitumoraux de la metformine (77), en conférant aux cellules cancéreuses la plasticité métabolique nécessaire pour s'adapter à l'inhibition du complexe I et de la phosphorylation oxydative (79). En effet, il est connu que l'inhibition du complexe I et de la phosphorylation oxydative par la metformine active la glycolyse par un mécanisme compensatoire. Ce mécanisme dépend d'AMPK dans plusieurs lignées de cancer du sein (80). Les cellules incapables d'effectuer ce remodelage métabolique, par exemple les cellules de cancer du côlon HCT116 p53^{-/-}, entrent en apoptose suite à un traitement à la metformine (79).

La metformine cible les cellules initiatrices de tumeur

Il a été démontré que la metformine ciblait sélectivement les TICs dans un modèle de cancer du sein (45). La metformine diminue la formation de sphères tumorales dans ce modèle, et l'analyse par FACS révèle une déplétion de la sous-population TICs mais pas du reste des cellules cancéreuses en culture (45). La metformine seule n'a pas d'effet sur la croissance de tumeurs dans des souris nude injectées avec des cellules MCF10A-ER-Src transformées. En comparaison, la doxorubicine, un agent chimiothérapeutique traditionnel, induit une diminution

initiale de la taille de la tumeur, suivie par une reprise de la croissance tumorale. La combinaison de la doxorubicine et de la metformine, quant à elle, bloque toute reprise de la croissance tumorale, un effet associé à une élimination des TICs telle que mesurée par FACS (45). Ces résultats soulignent la pertinence de combiner des traitements ciblant les TICs avec la chimiothérapie traditionnelle, et démontrent également la capacité de la metformine à cibler les TICs. Par contre, ils ne révèlent pas le mécanisme par lequel la metformine élimine les TICs.

Un autre groupe a démontré que la metformine ciblait les TICs dans plusieurs lignées de cancer du pancréas (46). En effet, la metformine diminue la formation de sphères tumorales, la formation de colonies et la fréquence des TICs telle que mesurée par essai de xénogreffe. La metformine diminue également la proportion de cellules en phase S et augmente l'apoptose des cellules cultivées en sphères tumorales, donc enrichies en TICs (46). Ces effets étaient indépendants d'AMPK/mTOR (46), ce qui suggère que le mécanisme par lequel la metformine affecte les TICs ne passe pas par l'activation d'AMPK.

Dans un modèle cellulaire de transformation de cancer du sein, la phenformine diminue les niveaux de SAM dans les TICs, et la metformine induit une accumulation d'homocystéine et de folate (81). Dans une autre étude utilisant des lignées de cancer du sein, la metformine a une signature métabolique similaire à celle des thérapies antifolates tel le méthotrexate (68). Ces données suggèrent que la metformine pourrait affecter les TICs en ciblant le métabolisme du carbone.

Le métabolisme du carbone

Le métabolisme du carbone est composé de deux cycles ou modules métaboliques liés : le cycle du folate et celui de la méthionine (figure 3, p.15). La sérine, synthétisée *de novo* ou absorbée par la cellule, peut être convertie en glycine par les enzymes sérine hydroxyméthyltransférase 1 et 2 (SHMT1/2), en transférant une unité carbone de la sérine au tétrahydrofolate (THF), le convertissant ainsi en 5,10-méthylène-THF. La glycine peut être à son tour décarboxylée dans la mitochondrie, transférant une autre unité carbone au THF sous forme 5,10-méthylène-THF. Le 5,10-méthylène-THF peut ensuite être converti en 10-formyl-THF, utilisé pour la synthèse *de novo* de purines. Le 5,10-méthylène-THF peut également être converti en 5-méthyl-THF par l'enzyme MTHFR (méthylène-THF réductase). Le 5-méthyl-

THF peut alors être conjugué à l'homocystéine pour produire le THF et la méthionine. L'unité carbone transportée par le folate est ainsi transférée au cycle de la méthionine. La méthionine peut être conjuguée à l'ATP par les enzymes méthionine adénosyltransférases (MAT) pour former du S-adénosyl-(L)-méthionine (SAM). Le SAM est le principal donneur de méthyl de la cellule. En effet, il sert de donneur pour plus de 90% des réactions de méthylation effectuées par au moins 50 méthyltransférases cellulaires (82), ce qui l'implique dans des réactions aussi variées que la méthylation de l'ADN, de protéines, de l'ARN, la synthèse de la phosphatidylcholine et la synthèse des polyamines (83). SAM est un inhibiteur allostérique de l'enzyme MTHFR, qui convertit le 5,10-méthylène-THF en 5-méthyl-THF, dont l'unité carbone est ensuite transférée au cycle de la méthionine et ultimement au SAM (70). Ceci permet de réguler la quantité de SAM synthétisée à partir des unités carbones, et de rediriger ces unités ailleurs si la quantité de SAM est déjà suffisante.

Le métabolisme du carbone est également lié à la biosynthèse de la glutathione. En effet, l'homocystéine du cycle de la méthionine peut être convertie en cystathionine, qui elle est subséquemment convertie en cystéine et en alpha-cétobutyrate. La cystéine peut ensuite être utilisée pour la synthèse de la glutathione (83). Cette voie ne dépend pas des unités carbones, puisque l'homocystéine est issue du S-adénosyl-(L)-homocystéine, qui correspond au S-adénosyl-(L)-méthionine moins son unité carbone (83). Par contre, la synthèse de la glutathione à partir de l'homocystéine diminue le flux de la réaction de la méthionine synthase (MS), qui transfère l'unité carbone du 5-méthyl-THF à l'homocystéine pour produire la méthionine. Donc la synthèse de la glutathione, en déplaçant l'homocystéine, peut réduire le transfert des unités carbone du cycle du folate à celui de la méthionine. De plus, puisque la seule réaction qui peut effectuer le 5-méthyl-THF est celle catalysée par la méthionine synthase, une diminution trop importante de la quantité d'homocystéine et un arrêt de cette réaction peut engendrer un mécanisme de « piège à folates », où le 5-méthyl-THF ne peut être régénéré en THF et son unité carbone est donc coincée et inutilisable par la cellule (68, 84).

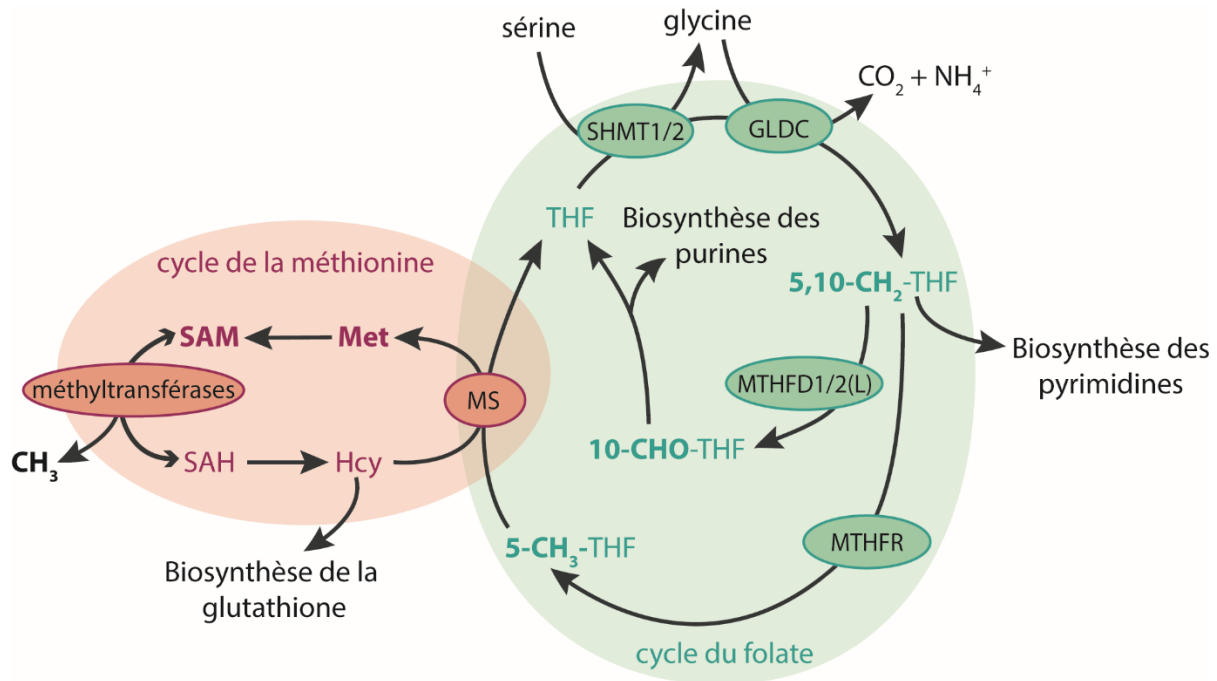


Figure 3. Métabolisme du carbone.

Le métabolisme du carbone est composé des cycles du folate et de la méthionine (indiqués en vert et orange, respectivement). La sérine peut être convertie en glycine par SHMT1/2, générant une unité carbone sous la forme de 5,10-méthylène-THF (5,10-CH₂-THF). La glycine résultante peut être décarboxylée dans la mitochondrie par la glycine décarboxylase, générant une seconde unité carbone. Le 5,10-méthylène-THF peut être utilisé pour la synthèse des pyrimidines, ou être converti en 10-formyl-THF (10-CHO-THF) par les enzymes MTHFD1/2(L). Le 10-formyl-THF est utilisé dans la synthèse des purines. Le 5,10-méthylène-THF peut alternativement être converti en 5-méthyl-THF (5-CH₃-THF) par la MTHFR. Le cycle du folate et celui de la méthionine sont couplés par le transfert du carbone du 5-méthyl-THF à l'homocystéine par la méthionine synthase pour former la méthionine. La méthionine peut être convertie en S- adénosyl-(L)-méthionine, qui est le principal donneur de méthyl de la cellule.

Les unités carbones sont indiquées en gras.

GLDC : glycine décarboxylase; Hcy : homocystéine; Met : méthionine; MS : méthionine synthase; MTHFD1/2(L): méthylène-THF déshydrogénase 1, 2 ou 2-like; MTHFR : méthylène-THF réductase; SAH : S-adénosyl-(L)-homocystéine; SAM : S-adénosyl-(L)-méthionine ; THF : tétrahydrofolate; SHMT1/2 : sérine hydroxyméthyltransférase 1/2.

Extrants du métabolisme du carbone

Le cycle du carbone est essentiel à la croissance cellulaire car il génère des purines, des pyrimidines, la méthionine, la glutathione, la phosphatidylcholine ainsi que d'autres lipides membranaires, en plus des méthyls fournis par SAM à toute une panoplie de réactions cellulaires (83). Les extrants du métabolisme du carbone peuvent paraître extrêmement variés, mais ils se regroupent en fait en deux grandes catégories : les extrants dépendant des unités carbonées, et ceux dépendant du NADPH.

Unités carbone

Les unités carbonées sont le cœur du métabolisme du carbone. Elles sont converties sous différentes formes afin d'être utilisées dans la biosynthèse de macromolécules essentielles à la division cellulaire. Le 10-formyl-THF permet la synthèse *de novo* des purines (68). Deux équivalents 10-formyl-THF sont nécessaires pour la synthèse d'un anneau purine (85). En effet, le 10-formyl-THF fournit une unité carbone pour la conversion du glycinamide ribonucléotide (GAR) en formylglycinamide ribonucléotide (FGAR), et fournit une autre unité carbone pour la conversion du 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) en *N*-formylaminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (FAICAR). Le FAICAR est ensuite converti en inosine monophosphate (IMP), qui est le précurseur de l'AMP et du GMP.

Le 5,10-méthylène-THF, quant à lui, est utilisé pour la synthèse de pyrimidines, où il participe à la conversion de déoxyuridine monophosphate (dUMP) en déoxythymidine monophosphate (dTMP) (68, 83). La méthionine, en tant qu'acide aminé, peut être utilisée pour la synthèse de protéines. Le S-adenosyl-(L)-méthionine, comme mentionné précédemment, est le principal donneur de méthyl de la cellule (83).

L'interconversion entre les différentes formes d'unités carbonées dans le cycle du folate se fait par les enzymes MTHFD1 (méthylène-THF déshydrogénase 1) dans le cytosol et MTHFD2/MTHFD2L (méthylène-THF déshydrogénase 2; *2-like*) dans la mitochondrie. Ces enzymes catalysent l'interconversion réversible du 5,10-méthylène-THF en 5,10-méthényl-THF puis en 10-formyl-THF (figures 3 et 4, p.15 et 24) (86). MTHFD1 et MTHFD2L sont NADPH-dépendantes, tandis que MTHFD2 est NADH-dépendante (87). MTHFD2 n'est exprimée que chez l'embryon et est surexprimée dans certaines cellules transformées (88),

tandis que MTHFD2L est habituellement exprimée chez l'adulte et dans les tissus différenciés (87).

NADPH

Une autre partie des extrants du métabolisme du carbone dépend en fait de la génération de NADPH par plusieurs des enzymes de ce métabolisme. En effet, le métabolisme du carbone génère une proportion importante du NADPH cellulaire, avec une contribution égale à celle de la voie pentose phosphate et largement supérieure à celle de l'enzyme malique (85). Ce NADPH est généré par les enzymes MTHFD1 dans le cytosol et MTHFD2L dans la mitochondrie lors de l'oxydation du méthylène-THF en 10-formyl-THF (85). L'enzyme formyl-THF déshydrogénase (FTHFD) peut également générer du NADPH dans la mitochondrie et le cytosol en oxydant le 10-formyl-THF en THF et CO₂ (85). Par contre, dans ce cas, l'unité carbone transportée par le 10-formyl-THF est perdue sous forme de CO₂.

Notons que le métabolisme du carbone peut aussi consommer du NADPH, à travers l'enzyme NADPH-dépendante méthylène-THF réductase (MTHFR), qui convertit le 5,10-méthylène-THF en 5-méthyl-THF (86).

Tableau I. Extrants du métabolisme du carbone selon leur provenance

Source	Unité carbone	NADPH
Extrants	Purines	Biosynthèse des acides gras
	Pyrimidines	Réduction de la glutathione oxydée
	Méthionine	Activité du cytochrome P450
	S-adénosyl-(L)-méthionine	
	Phosphatidylcholine	
	Polyamines	
	Méthylation	

Rôle du NADPH (vs NADH)

Le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) est l'un de deux transporteurs d'électrons activés de la cellule, l'autre étant le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide). La différence entre les deux est structurellement minime : le NADPH possède simplement un phosphate supplémentaire, éloigné de sa région transportant les électrons – qui possède donc la même réactivité chimique que celle du NADH (89). Pourtant, les fonctions du NADPH et du NADH sont très différentes. En effet, leur différence de structure fait en sorte que le NADPH et le NADH sont reconnus par des enzymes différents – seuls quelques rares enzymes, soit la glutamate déshydrogénase et la nicotinamide nucléotide transhydrogénase, sont capables d'utiliser les deux (90, 91). Cela permet à la cellule de séparer les fonctions biologiques des deux donneurs d'électrons (89).

Le NADH est principalement généré par le cycle de Krebs, quoiqu'il est également généré par certains enzymes du métabolisme du carbone, comme GLDC et MTHFD2 (87, 92). Le NADH est principalement consommé par la chaîne respiratoire mitochondriale, où il transfère ses électrons au complexe I afin de générer le gradient de protons qui permet la synthèse d'ATP (89). En général, il y a davantage de NAD^+ que de NADH dans la cellule, ce qui favorise la direction oxydative des réactions et permet au cycle de Krebs de tourner dans le sens qui génère de l'ATP. Ainsi, le NADH est généré par le catabolisme et est utilisé pour générer de l'énergie sous forme d'ATP.

Le NADPH, quant à lui, peut être produit par trois sources principales : la voie pentose phosphate, le métabolisme du carbone et l'enzyme malique (85). Dans le métabolisme du carbone, le NADPH peut être généré dans le cytosol par MTHFD1/MTHFD1L, et dans la mitochondrie par MTHFD2L et FTHFD (85-87). Le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ est généralement en faveur du NADPH, c'est-à-dire qu'il y a davantage de NADPH dans la cellule et donc que les réactions réductives sont favorisées (89). Le NADPH est utilisé dans le cytosol comme la mitochondrie pour la réduction de la glutathione oxydée, ce qui permet sa régénération et ainsi la protection contre le stress oxydatif (83, 93). Le NADPH est aussi essentiel au fonctionnement du cytochrome P450 et donc à la détoxification des poisons (94). Il est aussi nécessaire pour la synthèse des acides gras mitochondriaux et cytosoliques (95, 96).

Tableau II. Comparaison entre NADPH et NADH

	NADH	NADPH
<i>Impliqué dans</i>	Catabolisme	Anabolisme
<i>Ratio habituel</i>	$\text{NAD}^+ > \text{NADH}$	$\text{NADPH} > \text{NADP}^+$
<i>Forme réduite (NAD(P)H) générée par</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Cycle de Krebs • Métabolisme du carbone 	<ul style="list-style-type: none"> • Voie pentose phosphate • Métabolisme du carbone • Enzyme malique • Isocitrate déshydrogénase • Glutamate déshydrogénase
<i>Forme réduite (NAD(P)H) consommée par</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Chaîne de transport d'électrons • Lactate déshydrogénase 	<ul style="list-style-type: none"> • Biosynthèse des lipides • Réduction de la glutathione oxydée • Cytochrome P450 • Glutamate déshydrogénase

Interconversion $NADH \rightarrow NADPH$

Le NADH et le NADPH peuvent être interconvertis dans la mitochondrie par l'enzyme nicotinamine nucléotide transhydrogénase (NNT) (97). Cette conversion utilise du NADH et du $NADP^+$ pour générer du NAD^+ et du NADPH. Elle dépend du gradient de protons, car une partie de l'énergie nécessaire au transfert provient de la translocation d'un proton vers la matrice mitochondriale (97). En présence d'un fort gradient de protons, la formation de NADPH est favorisée (98, 99). Il est toutefois possible, si le gradient de protons est faible, que la réaction s'inverse et que la NNT consomme du NADPH et du NAD^+ pour générer du $NADP^+$ et du NADH, ce qui pompe des protons hors de la matrice mitochondriale et augmente le gradient de protons (98).

Autres sources de NADPH

Si une grande partie du NADPH cellulaire est issue du métabolisme du carbone (85), il peut également être généré par d'autres voies métaboliques. Le principal contributeur à la production de NADPH, avec le métabolisme du carbone, est la voie pentose phosphate (PP) (85). Cette voie utilise le glucose-6-phosphate produit par l'hexokinase immédiatement après l'entrée du glucose dans la cellule, plutôt que de le laisser poursuivre dans la voie de la glycolyse. L'enzyme limitante de la voie PP est la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), une déshydrogénase $NADP^+$ -dépendante. La voie PP est constituée de deux phases, la première étant oxydative et la seconde non-oxydative. Le NADPH est produit par deux enzymes de la phase oxydative : la G6PD et la 6-phosphogluconate déshydrogénase. Ces réactions sont irréversibles, et aboutissent à la formation du ribulose-5-phosphate (100). La phase non-oxydative de la voie PP est constituée de réactions réversibles qui peuvent régénérer des intermédiaires de la glycolyse ou les recruter pour synthétiser des produits de la voie PP, dépendant de la direction du flux métabolique (100). Elle commence par la conversion du ribulose-5-phosphate en ribose-5-phosphate, le pentose utilisé dans la synthèse des acides nucléiques (100). Si la voie non-oxydative régénère des intermédiaires de la glycolyse, alors l'extrait net de la voie PP sera uniquement le NADPH, le ribose-5-phosphate étant consommé afin de régénérer le fructose-6-phosphate et le glycéraldéhyde-3-phosphate (100). Cela se produit principalement dans des cellules nécessitant la production de NADPH pour la protection

contre le stress oxydatif mais ne se divisant pas rapidement. Dans les cellules en division rapide – comme les cellules cancéreuses – la voie PP génère la majorité du ribose-5-phosphate utilisé dans la synthèse des ribonucléotides (100). La voie PP se déroulant dans le cytoplasme, le NADPH qu'elle génère peut y être utilisé directement pour la synthèse des acides gras.

Le NADPH est également produit par la conversion réversible de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate par les enzymes isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (IDH1/2), qui sont respectivement cytoplasmique et mitochondriale (97). Cette réversibilité de réaction, couplée à l'existence d'une isoforme cytoplasmique et d'une mitochondriale, permet à la cellule de transporter des équivalents NADPH de la mitochondrie au cytosol tel qu'expliqué plus loin.

Les enzymes maliques (ME1-3) sont également des producteurs de NADPH. Ils catalysent la conversion du malate en pyruvate, générant au passage du NADPH à partir du NADP^+ (85, 101). ME1 est cytoplasmique, tandis que ME2-3 sont mitochondriales, et la réaction est elle aussi réversible. Cela en fait des candidats possibles au transport d'équivalents NADPH, au même titre qu'IDH1/2. ME1 et 3 sont exclusivement NADP^+ -dépendantes, tandis que ME2 peut utiliser du NAD^+ ou du NADP^+ (101).

La dernière source de NADPH est la glutamate déshydrogénase (GLUD1/2), qui convertit le glutamate en alpha-cétoglutarate et ammoniac, et génère ainsi du NADPH à partir du NADP^+ (102). GLUD1 est localisée à la fois au cytoplasme et dans la mitochondrie, tandis que GLUD2 est exclusivement mitochondriale (102). La réaction est en théorie réversible, mais procède la majorité du temps dans le sens de la génération de NADPH, dû aux concentrations extrêmement élevées d'urée qui seraient requises pour que la réaction procède en sens inverse. En effet, le K_m de l'enzyme pour l'urée est d'environ 1 mM, ce qui est largement supérieur aux concentrations d'urée normalement trouvées dans la cellule (102). Du coup, il n'y a probablement pas de navette NADPH qui se fait par GLUD1/2.

Compartmentalisation du métabolisme du carbone

Le métabolisme du carbone est compartimentalisé. En effet, le THF ne peut franchir la membrane mitochondriale lorsqu'il contient une unité carbone. De même, le NADPH généré dans le cytosol ou la mitochondrie ne peut franchir librement la membrane mitochondriale (97).

La cellule a donc développé des moyens de transférer des équivalences d'unités carbones et de NADPH de la mitochondrie au cytosol, et inversement (figure 3, p.15).

En situation normale, la direction du flux va de la sérine/glycine vers le formate dans la mitochondrie, et du formate vers la méthionine dans le cytosol (86). Le formate est donc le véhicule des unités carbones mitochondriales vers le cytosol. En fait, il a été démontré que, dans des conditions normales, la mitochondrie génère la majorité des unités carbones de la cellule (87). Par contre, il a également été démontré que, dans les cellules HEK293T, la glycine était incorporée telle quelle dans l'anneau purine, suggérant que les unités carbone générées dans la mitochondrie par le système de clivage de la glycine n'étaient pas utilisées pour la synthèse de purines dans ce modèle (85).

La direction normale du flux implique également que le métabolisme du carbone génère du NADPH dans la mitochondrie, mais en consomme dans le cytosol (86). Il est toutefois intéressant de noter que, dans des cellules HEK293T, MTHFD1 contribue de manière importante à la production de NADPH, suggérant que le flux ne fonctionne pas toujours dans le sens oxydatif dans le cytosol (85). Dans tous les cas, la cellule doit être capable de transporter le NADPH généré dans la mitochondrie vers le cytosol, où il pourra être utilisé pour la synthèse des acides gras non mitochondriaux. Le transport d'équivalents NADPH peut se faire par deux couples d'enzymes : IDH1/2 ou ME1/3.

Le transport par IDH1/2 se fait par la conversion NADPH-dépendante de l'alpha-cétoglutarate en isocitrate par l'enzyme IDH2 (isocitrate déshydrogénase 2) dans la mitochondrie. L'isocitrate peut ensuite être converti en citrate, qui lui peut être transporté à travers la membrane mitochondriale. Une fois dans le cytosol, le citrate peut être reconverti en isocitrate et la réaction inverse, soit la conversion de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate et la génération de NADPH, est catalysée par l'enzyme IDH1 (isocitrate déshydrogénase 1) (figure 5, p.25) (97).

Le transport par les enzymes maliques, théoriquement possible mais non effectivement démontré, s'effectuerait de manière similaire. Les isoformes mitochondriales, ME2/3, convertiraient le pyruvate en malate dans la mitochondrie, consommant un NADPH mitochondrial. Le malate pourrait ensuite être exporté dans le cytosol par le transporteur malate-

alpha-cétoglutarate, où il pourrait être reconverti en pyruvate par ME1, générant un NADPH cytosolique et complétant le transport d'un équivalent NADPH de la mitochondrie au cytosol (figure 5, p.25).

Il a été démontré que, dans les îlots pancréatiques responsables de la sécrétion d'insuline, l'enzyme malique pouvait participer à une navette NADH/NADPH impliquant le pyruvate et le malate. Le pyruvate entrerait dans la mitochondrie, où il serait converti en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase, puis en malate. La conversion de l'oxaloacétate en malate par la malate déshydrogénase consomme une unité de NADH. Le malate retournerait alors dans le cytosol, où il serait reconverti en pyruvate par l'enzyme malique 1 (103). Cette navette convertit un équivalent NADH mitochondrial en un équivalent NADPH cytosolique. Elle consomme par contre un ATP mitochondrial durant le processus, ce qui la rend moins efficace que par exemple la navette NADPH par IDH1/2, ou la navette NADPH théorique composée uniquement des enzymes maliques. Mais ce résultat montre que les enzymes maliques ont effectivement le potentiel de servir de navette NADPH.

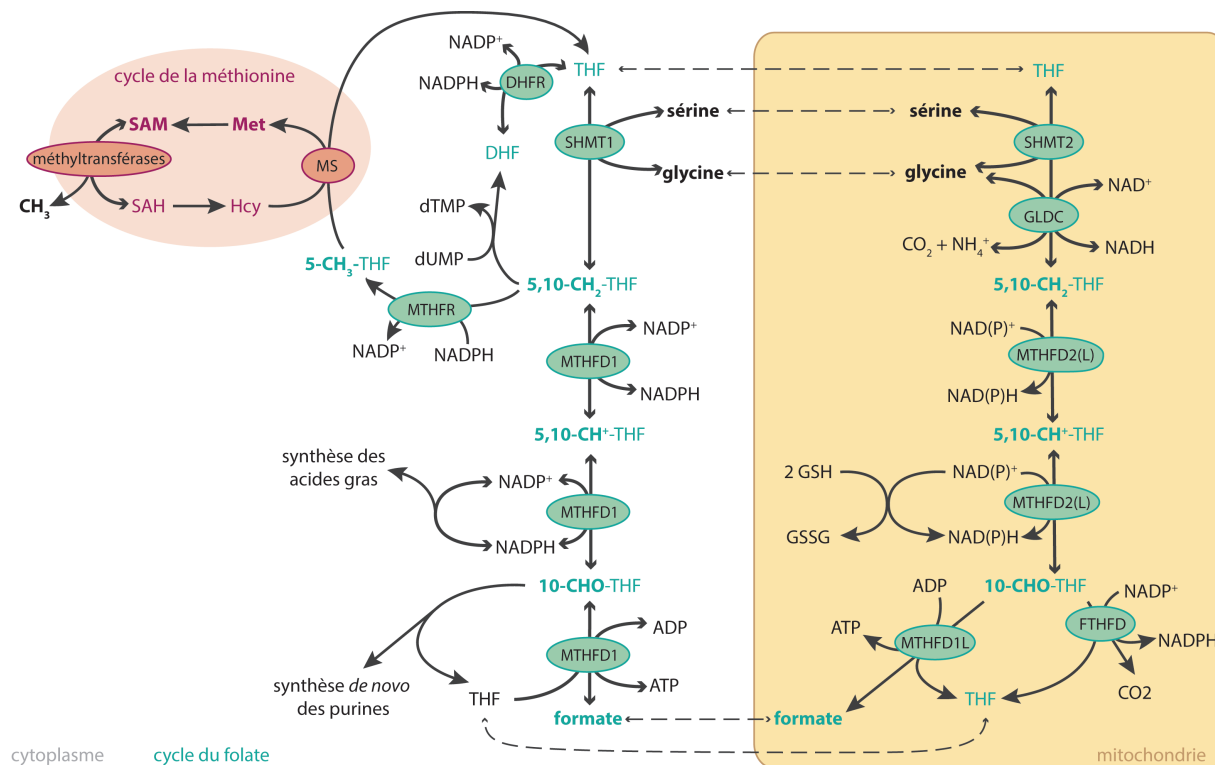


Figure 4. Compartimentalisation du métabolisme du carbone.

Le tétrahydrofolate (THF), la sérine, la glycine et le formate peuvent traverser la membrane mitochondriale, mais pas les formes de THF contenant des unités carbonées (5,10-CH₂-THF, 5,10-CH⁺-THF, 10-CHO-THF, 5-CH₃-THF), ni le NAD(P)⁺/NAD(P)H.

Cycle de la méthionine : orange; cycle du folate : vert. Les unités carbonées sont indiquées en gras.

SAM : S-adenosyl-(L)-méthionine; SAH : S-adenosyl-(L)-homocystéine; Hcy : homocystéine; met : méthionine; MS : méthionine synthase; THF : tétrahydrofolate; DHF : dihydrofolate; DHFR : dihydrofolate réductase; SHMT1/2 : sérine hydroxyméthyltransférase 1/2; GLDC : glycine décarboxylase; MTHFD1/2(L) : méthylène-THF déshydrogénase 1, 2 ou 2-like; MTHFD1L : méthylène-THF déshydrogénase 1-like; FTHFD : formyl-THF déshydrogénase.

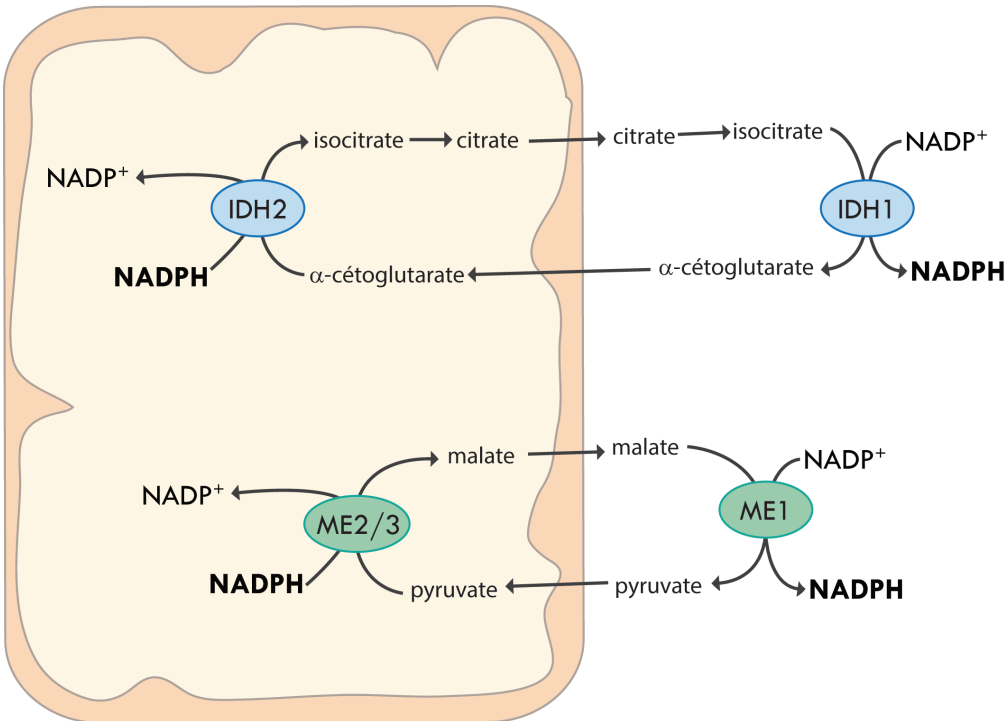


Figure 5. Navettes de NADPH.

Le couple d'enzymes IDH1/2 peut servir à transporter des équivalents NADPH de la mitochondrie au cytosol. IDH2 convertit l'alpha-cétoglutarate en isocitrate dans la mitochondrie, consommant une unité de NADPH. L'isocitrate est converti en citrate par l'aconitase mitochondriale. Le citrate est exporté de la mitochondrie par le transporteur de citrate. Dans le cytosol, le citrate est reconverti en citrate par l'aconitase cytosolique, et l'isocitrate est converti en alpha-cétoglutarate par IDH1, générant une unité de NADPH. Alternativement, les enzymes maliques pourrait théoriquement aussi servir de navette NADPH, en convertissant dans la mitochondrie le pyruvate en malate, consommant une unité de NADPH, puis en reconvertissant le malate en pyruvate dans le cytosol, générant une unité de NADPH. ME2 peut utiliser du NADP(H) ou du NAD(H), tandis que ME1/3 utilisent exclusivement du NADP(H).

IDH1/2 : isocitrate déshydrogénase 1/2; ME1-3 : enzyme malique 1-3

Le métabolisme du carbone dans le cancer

De par ses extrants essentiels à la croissance cellulaire et à la résistance au stress, le métabolisme du carbone est souvent hyperactivé dans les cellules cancéreuses (83). Il est donc depuis longtemps la cible de traitements chimiothérapeutiques. Par exemple, le méthotrexate, un agent chimiothérapeutique utilisé depuis plusieurs décennies dans le traitement du cancer, est un antifolate qui inhibe la dihydrofolate réductase et la tétrahydrofolate réductase, ce qui résulte en la disruption du métabolisme du carbone et tue les cellules cancéreuses (83).

Le NADPH et le cancer

Des données récentes soulignent le rôle important du NADPH pour les cellules cancéreuses. Sachant que le NADPH est requis pour la synthèse des acides gras (96, 104), et que sans synthèse des acides gras la division cellulaire est impossible, cela n'est pas étonnant. De plus, en permettant la régénération de la glutathione réduite à partir de la glutathione oxydée, le NADPH joue un rôle crucial dans la résistance des cellules cancéreuses au stress oxydatif (85, 100).

Plus précisément, il a été démontré que p53 peut réguler, dans des cellules de cancer du côlon HCT116, la production de NADPH par la voie pentose phosphate en inhibant la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), l'enzyme contrôlant l'entrée du glucose-6-phosphate dans la voie pentose phosphate (105). Il a également été démontré que p53 inhibe l'expression des enzymes maliques 1 et 2 (ME1/2), résultant en une diminution de leur production de NADPH (101). Ces résultats suggèrent un rôle important de p53 dans la régulation de la production de NADPH par les cellules cancéreuses, et montrent comment la perte de l'activité de p53 peut donc être avantageuse pour ces cellules.

Inversement, l'activation d'AMPK en absence de glucose permet de maintenir le niveau de NADPH et d'éviter la mort cellulaire car AMPK inhibe la synthèse des acides gras (enzymes ACC1/2) et donc la consommation de NADPH (76). Cela concorde avec la dualité de fonction d'AMPK par rapport au cancer : l'enzyme serait en effet suppresseur de tumeur au stade initial de la transformation, mais son activité présenterait un avantage de survie pour les cellules cancéreuses en leur conférant la plasticité métabolique nécessaire pour s'adapter au stress

énergétique (75-77). L'ensemble de ces données montre que le maintien des niveaux de NADPH est crucial pour la survie et la prolifération des cellules cancéreuses.

Le métabolisme du carbone dans les cellules initiatrices de tumeur : le cas de la glycine décarboxylase

La glycine décarboxylase (GLDC) est une enzyme faisant partie du système de clivage de la glycine, un complexe formé par l'association de quatre enzymes : l'enzyme H, l'enzyme P (GLDC), l'enzyme L et l'enzyme T. L'enzyme GLDC catalyse la décarboxylation de la glycine et l'attachement du groupement méthyl-amine restant sur la protéine H. La protéine T transfère l'unité carbone au THF, formant le 5,10-méthylène-THF et libérant de l'ammoniac, et la protéine L oxyde la protéine H afin de la restaurer à son état initial, générant du NADH (92). Ce système n'est présent que dans la mitochondrie. Les enzymes du système de clivage de la glycine sont encodées par le noyau et importées dans la mitochondrie grâce à un signal de localisation mitochondriale (92). Le système de clivage de la glycine est associé à la membrane interne de la mitochondrie et situé dans la matrice (92). Ainsi, si dans le cytosol seule la sérine peut générer des unités carbones par sa conversion en glycine par SHMT1, dans la mitochondrie la sérine et la glycine peuvent toutes deux générer des unités carbone (figure 3, p.15).

La consommation de glycine a été positivement corrélée avec la prolifération de lignées cancéreuses (106). De plus, il a été démontré que GLDC était le gène le plus surexprimé dans des TICs isolées à partir de tumeurs de cancer du poumon de patients comparativement à des tissus normaux ou aux cellules non-TICs présentes dans les mêmes tumeurs (107). La surexpression de GLDC permet l'acquisition de la capacité d'initiation tumorale dans des lignées auparavant bénignes, ce qui se traduit par la capacité de former des sphères tumorales, de proliférer en gélose molle et de former des tumeurs lors d'injections sous-cutanées chez la souris (107). Inversement, l'extinction de l'expression de GLDC par shARN dans des lignées malignes entraîne la diminution de la formation et de la taille des tumeurs ainsi que de la capacité à proliférer en gélose molle et de former des sphères tumorales (107, 108). Tout cela est dépendant de l'activité métabolique de GLDC (107). De plus, il a récemment été démontré que GLDC était surexprimé préférentiellement dans les lignées malignes dédifférenciées et conférait un avantage de survie en situation d'hypoxie (108).

Hypothèses et objectifs

Considérant 1) que nous cherchons une thérapie ciblant les cellules initiatrices de tumeur, 2) que la metformine cible les cellules initiatrices de tumeur, 3) que la metformine altère le métabolisme du carbone dans des patients et des lignées cellulaires et 4) que les cellules initiatrices de tumeur dépendent du métabolisme du carbone, particulièrement de la glycine décarboxylase, nous proposons que la metformine cible les cellules initiatrices de tumeur en affectant le métabolisme du carbone.

Contribution de l'étudiante

La vaste majorité des expériences, l'optimisation des méthodes, la présentation et l'analyse des résultats ont été réalisés par l'étudiante, tout comme la rédaction de l'article.

Xavier Deschênes-Simard a contribué en réalisant l'expérience de transcriptomique et en effectuant l'analyse de ce résultat. Il m'a également enseigné les techniques associées à la culture des cellules pancréatiques ductales ainsi que la technique de l'essai de sphères. Gerardo Ferbeyre a dirigé et supervisé mes travaux.

L'article présenté ici est une ébauche. Des expériences supplémentaires seront nécessaires avant que le manuscrit soit prêt pour la soumission. Une fois complété, l'article sera soumis au journal *PNAS*.

Glycine decarboxylase reduces metformin sensitivity of tumor-initiating cells

Short title: Glycine decarboxylase, metformin and tumor-initiating cells

Authors : Moineau-Vallée, K.¹, Deschênes-Simard, X.¹, Ferbeyre, G.¹

¹ Département de Biochimie, Université de Montréal, QC, Canada. 2900 blv Édouard-Montpetit, Montréal, QC, Canada, H3T 1J4.

Corresponding author : Ferbeyre, G.

Université de Montréal, Pavillon Roger-Gaudry, bureau E-515, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec), Canada. H3C 3J7.

Phone : 514 343-7571

Keywords : metformin; pancreatic cancer; tumor-initiating cells; one-carbon metabolism; cancer metabolism; NADPH; glycine decarboxylase

Abstract

Pancreatic cancer is one of the most chemoresistant cancers, with a 5-year survival rate lesser than 5% (1, 2). Tumor-initiating cells (TICs), also sometimes called cancer stem cells, which consist of a subpopulation of tumor cells with the unique ability to generate a new tumor and all cell types within it (3), are thought to be major contributors to chemoresistance (4). It has been shown that glycine decarboxylase (GLDC), an enzyme that cleaves glycine and generates carbon units that feed through one-carbon metabolism and NADPH generation, is both necessary and sufficient to the acquisition of tumor-initiating cell properties (5). Concurrently, metformin, a biguanide currently prescribed for type-2 diabetes treatment, has been shown to have anticancer, and specifically anti-TICs properties. However, the mechanism through which metformin targets TICs is unclear. Considering that data from patients and cell lines shows that metformin can alter one-carbon metabolism (6-11), and that one-carbon metabolism, through GLDC, has been shown to be important to TICs, we propose that metformin targets tumor-initiating cells by targeting one-carbon metabolism, specifically glycine decarboxylase. We show that GLDC is upregulated in malignant pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cell lines compared to benign cell lines; that our PDAC cell lines are sensitive to metformin, and that metformin treatment reduces *Gldc* mRNA levels. Interestingly, *Gldc* overexpression desensitizes cells to metformin. Metformin treatment increases $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio in PDAC cells, and this is reversed by *Gldc* overexpression. Overall, these results suggest that *Gldc* overexpression desensitizes TICs to metformin by restoring $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio.

Significance statement

The antidiabetes drug metformin has been shown to have anticancer, and specifically anti-tumor-initiating cell properties, but the mechanism through which metformin acts on tumor-initiating cells is still unclear. We show that metformin targets glycine decarboxylase, an essential component of one-carbon metabolism, and that overexpression of this enzyme desensitizes pancreatic cancer cells to metformin, possibly by restoring NADPH levels.

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the deadliest cancers, with a 5-year survival rate lesser than 5% (1, 2). This is partly due to early metastasis and chemoresistance (12). An hypothesis that has emerged to explain chemoresistance is that of tumor-initiating cells (TICs), also called cancer stem cells. This hypothesis postulates that there is only a small subpopulation of tumor cells, called TICs, that are capable of generating all cell types present within the tumor and of generating a new tumor. These TICs express stem cell markers, have the ability to enter quiescence, have increased resistance to DNA damage and oxidative stress and sometimes express ABC pumps (3, 4, 13-18). Together, these characteristics make TICs extremely resistant to traditional chemotherapy. For this reason, new therapies specifically targeting TICs must be developed.

Glycine decarboxylase is part of the glycine cleavage system, which cleaves glycine to generate one carbon unit, NADH, ammonia and CO₂ (19). The carbon unit generated by this reaction is transferred to tetrahydrofolate (THF), thus forming 5,10-methylene-THF and entering one-carbon metabolism. One-carbon metabolism is composed of the interconnected folate and methionine cycles (20). Its outputs include carbon units for purine and pyrimidine synthesis, in the form of 10-formyl-THF and 5,10-methylene-THF, and for methylation, in the form of S-adenosyl-(L)-methionine (SAM) (21). It also generates a great part of the NADPH required by cancer cells for growth and oxidative stress resistance (22). It has been shown that glycine decarboxylase metabolic activity is both necessary and sufficient for tumor-initiating cells in lung cancer (5), but the mechanistic basis for this is unclear.

Metformin is a biguanide widely used for type II diabetes treatment, which has been recently shown by a variety of studies to have anticancer effects (23, 24). Interestingly, metformin seems to specifically target TICs (25, 26). It has also been shown that metformin alters one-carbon metabolism in patients (8, 10, 27) and cell lines (6, 28).

Considering this, we propose that metformin targets TICs by targeting one-carbon metabolism. Here we use an *ex-vivo* model of pancreatic cancer progression to demonstrate

that *Gldc* is upregulated in malignant PDAC cells compared to benign PanIN cells. Metformin reduces *Gldc* mRNA levels. Interestingly, overexpression of *Gldc* dramatically reduces TICs sensitivity to metformin in a tumor sphere assay. Cells treated with metformin show an important increase in NADP⁺/NADPH ratio, indicating decreased NADPH production, which is largely dependent on one-carbon metabolism (22). Overexpression of *Gldc* reverts this phenotype. Together these results suggest that metformin reduces tumor sphere formation by reducing NADPH production, and this could be due to reduced flux through one-carbon metabolism (6, 11, 25).

Results

In order to understand the changes that distinguish between malignant pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and benign pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN), we used cell lines established from PDAC or PanIN lesions in PDX1-Cre, LSL-Kras^{G12D} mice – respectively, AH375 and 1499 cells – and compared their transcriptome through a microarray analysis. This revealed a strong mitochondrial signature in the PDAC cells compared with the PanIN cells (fig. 1A, p. 47). One of the genes that was most strongly upregulated in PDAC was *Gldc*, consistent with data reporting GLDC enrichment in lung TICs from patients (5). This increased expression was confirmed by RT-qPCR (fig. 1B, p.47). This data indicated that AH375 cells might be dependent on *Gldc* and the surrounding metabolism – namely, glycine-serine/one-carbon metabolism.

We then wanted to test if our PDAC cell lines were sensitive to metformin. In particular, we wanted to know if the TICs in these cell lines were sensitive to metformin, because we are interested in how metformin targets TICs rather than all cancer cells. So we did a tumor sphere assay to estimate *in vitro* the capacity of TICs in AH375 and NB508 cell lines to form tumor spheres under metformin treatment (fig. 2A, p.48). Both cell lines were sensitive to metformin, the AH375 cells markedly more so (fig. 2A, p.48). Because of this increased sensitivity, AH375 cells were a better model to characterize the mechanism of metformin sensitivity and so were used in all subsequent experiments.

We then wanted to know if metformin treatment affected Gldc expression in AH375 cells, so we measured Gldc mRNA levels by RT-qPCR. This revealed that metformin treatment decreased Gldc expression (fig. 2B, p.48).

To determine if this decrease in Gldc mRNA levels was important to the effect of metformin on TICs, we overexpressed Gldc (fig. 3, p.49). Indeed, if Gldc mRNA decrease is necessary for the inhibition of tumor sphere formation by metformin, then overexpressing it should reduce metformin sensitivity in a tumor sphere assay. This is indeed the case (fig. 3B, p.49).

To determine how GLDC overexpression protects against metformin effects, we first looked at the inputs and outputs of the GLDC enzymatic reaction. The glycine cleavage system generates one carbon unit in the form of 5,10-methylene-THF, one NADH unit, ammonia and CO₂, and it consumes glycine, NAD⁺ and THF (19). It has been shown that carbon units deficiency can be caused by glycine accumulation, causing a growth arrest which can be rescued by formate supplementation (29). Indeed, formate can conjugate with THF through 10-formyl-THF synthetase to form 10-formyl-THF, which is used for purine synthesis (21). Formate supplementation does not rescue tumor sphere formation under metformin treatment in our system (fig. S1A, p.52). Conversely, since carbon units can also be used for methylation reactions through formation of SAM, we tried supplementing metformin-treated tumor spheres with SAM to test if this would reduce metformin sensitivity (fig. S1B, p.52). It did not.

We next considered whether glycine accumulation could be causing toxicity to TICs and thus preventing tumor sphere formation. It has indeed been shown that glycine excess is detrimental to cancer cell proliferation by reversing the flux of one-carbon metabolism in the mitochondria, causing a consumption of one carbon units and preventing purine synthesis (29). However, since formate supplementation does not rescue tumor sphere formation in our system, this is probably not the case. It has also been shown that glycine excess can be detrimental when GLDC activity is low because glycine is then catabolized by GCAT, and this in turn generates aminoacetone and methylglyoxal, which are highly toxic metabolites (30). So we tested if glycine excess alone could prevent tumor sphere formation, and this is indeed the case (fig. S2A, p.53). If metformin toxicity was

mediated by glycine excess, then co-treatment with glycine should increase metformin efficiency. However, this is not the case (fig. S2B, p.53). So it would seem that glycine excess is not mediating metformin effect on TICs in our model.

It is known that metformin causes NADH accumulation in the mitochondrial matrix due to its inhibition of complex I (31-33), so it seemed unlikely that GLDC overexpression decreased metformin sensitivity by increasing NADH levels in the mitochondria. However, it has been shown that, in whole cells, metformin treatment can result in an increase of the NAD^+/NADH ratio (34), possibly reflecting depletion of cytosolic NADH due to increased lactate dehydrogenase activity (35). Indeed, in our model metformin treatment induces an increase of the NAD^+/NADH ratio in whole cells, and Glc-*overexpressing* cells treated with metformin display an even higher NAD^+/NADH ratio, indicating that Glc overexpression depletes NADH even further than metformin treatment in whole cells (fig. 4A, p.50).

Finally, we considered whether Glc could restore flux of one-carbon metabolism and one of its main outputs outside of carbon units, NADPH (22, 36). Glc overexpression restores $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio to lower levels than seen in vector cells under metformin treatment (fig. 4B, p.50). Considering that NADPH is essential to lipid synthesis, cytochrome P450 function and reduction of oxidized glutathione (37), this restoration of NADPH levels in Glc-*overexpressing* cells could very well be what is mediating their ability to form tumor spheres under metformin treatment.

This data leads us to propose a model in which metformin inhibits complex I; this inhibition would then cause the mitochondria to transmit a signal – as yet unknown – which would result in reduced Glc mRNA levels. Alternatively, metformin could target Glc mRNA levels independently of complex I inhibition. In both cases, Glc mRNA level decrease would ultimately result in lower Glc activity, which would cause decreased NADPH production by Mthfd2L and Fthfd due to reduced flux through one-carbon metabolism. This decrease in NADPH levels relative to NADP^+ would impair fatty acid biosynthesis, glutathione regeneration and cytochrome P450 activity (fig. 5, p.51). Together these effects might explain the decrease of tumor sphere formation under metformin treatment.

Discussion

Glycine accumulation-induced toxicity

It has been previously shown that excess glycine can be detrimental to cell growth (22, 29) or even toxic (30). It has been suggested that this could be due to depletion of one-carbon units (29), but considering that in our system neither formate nor SAM supplementation rescues tumor sphere formation, it is unlikely that this factor explains the actions of metformin here. It has also been shown that glycine excess in cells with low GLDC activity is toxic because glycine is metabolized to acetone and eventually methylglyoxal, which causes macromolecular damage through glycation of molecules, particularly lysine and arginine residues of proteins (30). However, since metformin neutralizes advanced glycation endproducts (AGEs) formation by methylglyoxal (38-40), it is unlikely that methylglyoxal and AGEs accumulation is what is causing the toxicity of metformin in TICs here. It has been proposed that inversion of one-carbon flux caused by excess glycine is decreasing cell proliferation not only because of one-carbon units depletion, but rather because of NADPH depletion (22). This could very well be the case here. However, we cannot see an additive effect of combinatory metformin and glycine treatment which would suggest that glycine accumulation is indeed part of the mechanism of action of metformin (fig. S2B). This might be due to the fact that cells under metformin treatment do not uptake most of the excess glycine in the medium. It has been shown that glycine uptake is only about 35% in cells grown in DMEM medium containing 0.4 mM labeled glycine (22). Use of esterified glycine, which can readily cross cellular membranes, might clarify this issue.

Increase of NAD^+/NADH ratio under metformin treatment

The generally accepted target of metformin is complex I of the mitochondrial respiratory chain (33, 41-44). One consequence of this inhibition is accumulation in the mitochondrial matrix of NADH, which can't be reconverted to NAD^+ by transferring its electrons to complex I. This results in a decrease of the NAD^+/NADH ratio in the mitochondria. Knowing this, the result presented in fig. 4A – that is, the increase of

NAD⁺/NADH ratio in the presence of metformin – can seem surprising. However, this experiment was performed on whole cell extracts, and it has been shown that, on whole cells, metformin can increase the NAD⁺/NADH ratio (34). This might be due to increased fermentation through lactate dehydrogenase, which consumes NADH to regenerate NAD⁺ (35).

Metformin and NADPH, a new relationship

NADPH is mostly used in fatty acid synthesis in cancer cells (22). However, membrane fatty acid synthesis occurs in the cytosol but GLDC-related NADPH is generated in the mitochondria. This suggests a key role for the NADPH shuttle in transferring NADPH equivalents to the cytosol, and highlights it as a potential anticancer target.

It has previously been shown that metformin impairs fatty acid synthesis (45, 46). However, it only slightly decreased NADPH levels in LNCaP cells (46), which does not reflect the dramatic increase in NADP⁺/NADPH ratio we see here. This might be due to the fact that the authors did not measure NADP⁺ levels, and therefore could not calculate NADP⁺/NADPH ratio, which might be affected by increased NADP synthesis for example. It could also be due to the fact that K-Ras constitutive activation in our PDAC cell line AH375 already remodels metabolism in a way that primes it for susceptibility to fatty acid synthesis inhibition by metformin, as previously described (45).

It has been previously shown that p53 can regulate, in colon cancer cell line HCT116, NADPH production through the pentose phosphate pathway (PPP) by inhibiting glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), the enzyme that controls glucose-6-phosphate entry into the PPP (47), which is the main source of NADPH production besides one-carbon metabolism (22). It has also been shown that p53 can inhibit malic enzymes 1 and 2, decreasing their NADPH production (48). These results suggest that p53 activation could mediate the effects of metformin in our model. However, this seems unlikely, given that one of the PDAC cell lines we used for our experiments, the NB508 cell line, was established from a Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};p53^{Lox/+};p16^{+/-} mouse model (49), yet was still sensitive to metformin in a tumor sphere assay and displayed decreased Glc expression

under metformin treatment. On the other hand, NB508 cells were less sensitive to metformin than AH375 cells (whose p53 status is unknown), and so it is possible that p53 does play a role in the decrease in NADPH/NADP⁺ ratio in PDAC cells. It could simply play a lesser role in the p53-heterozygous NB508 cell line, perhaps explaining its decreased metformin sensitivity compared to the AH375 cell line. However, since Gldc overexpression restores NADP⁺/NADPH ratio in AH375 cells, this probably indicates that the decreased NADPH production under metformin treatment is due to decreased one-carbon metabolism activity rather than decreased PPP or malic enzyme activity.

Another intriguing possibility is that PDAC tumor-initiating cells are particularly sensitive to metformin because they rely more on Gldc-related one-carbon metabolism to generate NADPH than non-TICs. This is quite possible considering that GLDC is very strongly expressed in undifferentiated compared to differentiated normal and cancer cells (5, 30).

Regulation of GLDC mRNA levels by metformin

Although direct metformin target(s) are not definitely established, it is generally accepted that complex I is inhibited by metformin (33, 41, 42). This work has established that metformin also decreases Gldc mRNA levels, although the mechanism through which it does so is unclear, and the link to complex I inhibition – if it exists – has not been elucidated. It is possible that complex I inhibition triggers a signal to the nucleus that reduces transcription of Gldc and possibly other NADPH-producing genes such as Mthfd2L and Mthfd1.

The decrease in Gldc mRNA levels observed under metformin treatment could be due to either reduced transcription or increased levels and/or activity of miRNAs targeting it. The miR-30 family and miR-874 both have potential target sites, as determined by the DIANA tools (50, 51), in the GLDC mRNA and are known to be tumor suppressors that are downregulated in cancer (52-62) and upregulated by metformin treatment (63, 64), which makes them likely candidates for this regulation.

Materials and methods

Plasmids and reagents

Metformin hydrochloride (#PHR1084, Sigma-Aldrich) and formate (#67253, Sigma-Aldrich) were diluted in water; glycine (#GLN001.5, Bioshop) was diluted in F12-DMEM; S-adenosyl-(L)-methionine (#A7007, Sigma-Aldrich) was diluted in DMSO. Metformin, formate, glycine and/or S-adenosyl-(L)-methionine were replenished every 2 days after starting treatments.

The MSCV-hygro/Gldc vector used for Gldc overexpression was subcloned from pCMV6-Kan/Neo/Gldc (#MC205351, Origene) into an MSCV-hygro backbone using restriction digest with enzymes Sall/PmeI on pCMV6-Kan/Neo/Gldc and XhoI/HpaI on MSCV-hygro.

Cell culture and retroviral-mediated gene transfer

1497, 1498 and 1499 pancreatic ductal cell lines, as well as the transformed AH375 and NB508 PDAC cell lines were a kind gift from Dr Nabeel Bardeesy's lab. 1497, 1498, 1499 and AH375 cell lines were isolated as previously described (65) from 9-week-old (1497, 1498, 1499) or 52-week-old (AH375) Pdx1-Cre;LSL-KRas^{G12D} mouse. The NB508 cell line was established from a Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};p53^{Lox/+};p16^{+/-} mouse as described previously (49).

Cells were cultured in the following conditions: 1497, 1498, 1499 and AH375 cells were propagated on laminin-coated plates (#354239, BD Biosciences) in a pancreatic medium consisting of DMEM-F12 (#11330-032, Gibco) supplemented with 5 mg/ml D-glucose, 1.22 mg/ml Nicotinamide (N-3376, Sigma), 5 nM 3,3',5-triiodo-L-thyronine (#91990, Sigma), 1 μ M Dexamethasone (D1756, Sigma), 100 ng/ml Cholera toxin (C8052, Sigma), 5 ml/L ITS+ (#354352, BD Biosciences), 0.1 mg/ml Soybean Trypsin Inhibitor type 1 (T6522, Sigma), 20 ng/ml EGF (#5331-LF, Cell Signaling Technology), 5% Nu-Serum IV (#355104, BD Biosciences), 25 μ g/ml Bovine Pituitary Extract (13028-014, Gibco) and 1% P/S. NB508 cells were cultured in DMEM (#319-015-CL, Wisent)

supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent) and 1% penicillin G/streptomycin sulfate (P/S; Wisent). Cells were passaged using Tryple E (#12604-013, Gibco), except for NB508 cells which were passaged using trypsin-EDTA 1X (Stock 10X; 325-052-EL, Wisent). Retroviral-mediated gene transfer were performed as previously described (66).

Microarray gene expression analysis

Microarray samples and analysis were performed as previously described (67). GEO accession number: GSE57566.

Western blot

Western blot was performed as described previously (66). Antibodies used were anti-GLDC (ab97625, Abcam, 1:1000) and anti-beta-actin (#3700, Cell Signaling Technology, 1:1000). Band quantification was done using ImageJ or Image Lab 4.0 (Bio-Rad).

Real time quantitative PCR

RT-qPCR was performed as described previously (67). Primers used for Glc6pase mRNA amplification were forward: 5'-tcaatagctcctccgaacttgc-3' and reverse: 5'-gcacaaaggggtggatgttg-3'.

NAD(P)t and NAD(P)H quantification

NADP/NADPH quantitation colorimetric kit (#K347-100) and NAD/NADH quantitation colorimetric kit (#K337-100) from Biovision were used according to manufacturer's instructions.

Tumor sphere assay

Tumor sphere assays were performed in 24-well ultra-low attachment plates (#3473, Corning). In each well, 1,000 cells were plated in 1 mL DMEM-F12 medium (#11039-021, Gibco) supplemented with 1X B-27 Supplement (#17504-044, Gibco) and

20 ng/mL EGF and FGF (#5331-LF and #5414-LF, Cell Signaling Technology). Cells were incubated with 5% CO₂ at 37°C and fresh supplements (B27, EGF, FGF) were replenished every 5 days. After 10 days, tumor spheres were counted using a microscope.

Statistics

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software). Data are presented as means \pm SD and were analysed by Student's t-test (two-tailed). A p-value < 0.05 was considered statistically significant. All figures show representative results of at least 2 biologically independent experiments.

Acknowledgements

We thank Dr Nabeel Bardeesy for the cell lines used in this paper. This work was supported by the NSERC and FRQS Graduate Scholarships Program to K. Moineau-Vallée. X. Deschênes-Simard was supported by the Vanier Canada Graduate Scholarships Program and Michael Smith Foreign Study Supplements Program. G. Ferbeyre is a FRSQ national research fellow and is supported by grants from the Canadian Institute of Health and Research (CIHR MOP11151) and the Cancer Research Society.

References

1. Cancer Research UK (2014) Pancreatic cancer survival statistics.
2. Carpelan-Holmstrom M, *et al.* (2005) Does anyone survive pancreatic ductal adenocarcinoma? A nationwide study re-evaluating the data of the Finnish Cancer Registry. *Gut* 54(3):385-387.
3. Baccelli I & Trumpp A (2012) The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *The Journal of cell biology* 198(3):281-293.
4. Tanase CP, *et al.* (2014) Cancer stem cells: Involvement in pancreatic cancer pathogenesis and perspectives on cancer therapeutics. *World journal of gastroenterology : WJG* 20(31):10790-10801.
5. Zhang WC, *et al.* (2012) Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell* 148(1-2):259-272.
6. Corominas-Faja B, *et al.* (2012) Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism in a manner similar to the antifolate class of chemotherapy drugs. *Aging* 4(7):480-498.
7. Aarsand AK & Carlsen SM (1998) Folate administration reduces circulating homocysteine levels in NIDDM patients on long-term metformin treatment. *Journal of internal medicine* 244(2):169-174.
8. Carlsen SM, *et al.* (1997) Metformin increases total serum homocysteine levels in non-diabetic male patients with coronary heart disease. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 57(6):521-527.
9. de Jager J, *et al.* (2010) Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. *Bmj* 340:c2181.
10. Sahin M, Tutuncu NB, Ertugrul D, Tanaci N, & Guvener ND (2007) Effects of metformin or rosiglitazone on serum concentrations of homocysteine, folate, and vitamin B12 in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes and its complications* 21(2):118-123.
11. Cabreiro F, *et al.* (2013) Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell* 153(1):228-239.
12. Gungor C, Hofmann BT, Wolters-Eisfeld G, & Bockhorn M (2014) Pancreatic cancer. *Br J Pharmacol* 171(4):849-858.
13. Abdullah LN & Chow EK (2013) Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and translational medicine* 2(1):3.
14. Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, & Clarke MF (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Current opinion in genetics & development* 14(1):43-47.
15. Beck B & Blanpain C (2013) Unravelling cancer stem cell potential. *Nature reviews. Cancer* 13(10):727-738.
16. Fitzgerald TL & McCubrey JA (2014) Pancreatic cancer stem cells: Association with cell surface markers, prognosis, resistance, metastasis and treatment. *Advances in biological regulation* 56:45-50.
17. Galmozzi E, Facchetti F, & La Porta CA (2006) Cancer stem cells and therapeutic perspectives. *Current medicinal chemistry* 13(6):603-607.

18. O'Connor ML, *et al.* (2014) Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer letters* 344(2):180-187.
19. Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, & Hiraga K (2008) Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 84(7):246-263.
20. Locasale JW (2013) Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nature reviews. Cancer* 13(8):572-583.
21. Tibbetts AS & Appling DR (2010) Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annual review of nutrition* 30:57-81.
22. Fan J, *et al.* (2014) Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* 510(7504):298-302.
23. Decensi A, *et al.* (2010) Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 3(11):1451-1461.
24. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, & Morris AD (2005) Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ (Clinical research ed.)* 330(7503):1304-1305.
25. Janzer A, *et al.* (2014) Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
26. Lonardo E, *et al.* (2013) Metformin targets the metabolic achilles heel of human pancreatic cancer stem cells. *PloS one* 8(10):e76518.
27. Andres E & Federici L (2007) Vitamin B12 deficiency in patients receiving metformin: clinical data. *Archives of internal medicine* 167(7):729; author reply 730-721.
28. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsiachlis PN, & Struhl K (2009) Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer research* 69(19):7507-7511.
29. Labuschagne CF, van den Broek NJ, Mackay GM, Vousden KH, & Maddocks OD (2014) Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell reports* 7(4):1248-1258.
30. Kim D, *et al.* (2015) SHMT2 drives glioma cell survival in ischaemia but imposes a dependence on glycine clearance. *Nature* 520(7547):363-367.
31. Fendt S-M, *et al.* (2013) Reductive glutamine metabolism is a function of the α -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nature communications* 4.
32. Frizzell N, Thomas SA, Carson JA, & Baynes JW (2012) Mitochondrial stress causes increased succination of proteins in adipocytes in response to glucotoxicity. *The Biochemical journal* 445(2):247-254.
33. Owen MR, Doran E, & Halestrap AP (2000) Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal* 348 Pt 3:607-614.
34. Caton PW, *et al.* (2010) Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis through induction of SIRT1 and GCN5. *The Journal of endocrinology* 205(1):97-106.

35. Acharya AP, Rafi M, Woods EC, Gardner AB, & Murthy N (2014) Metabolic engineering of lactate dehydrogenase rescues mice from acidosis. *Sci Rep* 4:5189.
36. Tedeschi PM, *et al.* (2013) Contribution of serine, folate and glycine metabolism to the ATP, NADPH and purine requirements of cancer cells. *Cell death & disease* 4:e877.
37. Stanton RC (2012) Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life* 64(5):362-369.
38. Beisswenger P & Ruggiero-Lopez D (2003) Metformin inhibition of glycation processes. *Diabetes Metab* 29(4 Pt 2):6S95-103.
39. Kender Z, *et al.* (2014) Effect of metformin on methylglyoxal metabolism in patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 122(5):316-319.
40. Kiho T, Kato M, Usui S, & Hirano K (2005) Effect of buformin and metformin on formation of advanced glycation end products by methylglyoxal. *Clin Chim Acta* 358(1-2):139-145.
41. Andrzejewski S, Gravel SP, Pollak M, & St-Pierre J (2014) Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & metabolism* 2:12.
42. Matsuzaki S & Humphries KM (2015) Selective inhibition of deactivated mitochondrial complex I by biguanides. *Biochemistry* 54(11):2011-2021.
43. Viollet B, *et al.* (2012) Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science (London, England : 1979)* 122(6):253-270.
44. Wheaton WW, *et al.* (2014) Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *eLife* 3:e02242.
45. Cantoria MJ, Boros LG, & Meuillet EJ (2014) Contextual inhibition of fatty acid synthesis by metformin involves glucose-derived acetyl-CoA and cholesterol in pancreatic tumor cells. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* 10:91-104.
46. Loubiere C, *et al.* (2015) Metformin-induced energy deficiency leads to the inhibition of lipogenesis in prostate cancer cells. *Oncotarget*.
47. Jiang P, *et al.* (2011) p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature cell biology* 13(3):310-316.
48. Jiang P, Du W, Mancuso A, Wellen KE, & Yang X (2013) Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature* 493(7434):689-693.
49. Bardeesy N, *et al.* (2006) Both p16Ink4a and the p19Arf-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(15):5947-5952.
50. Paraskevopoulou MD, *et al.* (2013) DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic acids research* 41(Web Server issue):W169-173.
51. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, & Hatzigeorgiou AG (2012) Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 28(6):771-776.
52. Braun J, Hoang-Vu C, Dralle H, & Huttelmaier S (2010) Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas. *Oncogene* 29(29):4237-4244.

53. Ouzounova M, *et al.* (2013) MicroRNA miR-30 family regulates non-attachment growth of breast cancer cells. *BMC genomics* 14:139.
54. Ozcan S (2009) MiR-30 family and EMT in human fetal pancreatic islets. *Islets* 1(3):283-285.
55. Zhong Z, Xia Y, Wang P, Liu B, & Chen Y (2014) Low expression of microRNA-30c promotes invasion by inducing epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep* 10(5):2575-2579.
56. Jiang B, *et al.* (2014) miR-874 Inhibits cell proliferation, migration and invasion through targeting aquaporin-3 in gastric cancer. *J Gastroenterol* 49(6):1011-1025.
57. Kesanakurti D, Maddirela DR, Chittivelu S, Rao JS, & Chetty C (2013) Suppression of tumor cell invasiveness and in vivo tumor growth by microRNA-874 in non-small cell lung cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 434(3):627-633.
58. Nohata N, *et al.* (2011) Tumour suppressive microRNA-874 regulates novel cancer networks in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 105(6):833-841.
59. Nohata N, *et al.* (2013) Tumour-suppressive microRNA-874 contributes to cell proliferation through targeting of histone deacetylase 1 in head and neck squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 108(8):1648-1658.
60. Volinia S & Croce CM (2013) Prognostic microRNA/mRNA signature from the integrated analysis of patients with invasive breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(18):7413-7417.
61. Wang L, Gao W, Hu F, Xu Z, & Wang F (2014) MicroRNA-874 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human breast cancer by targeting CDK9. *FEBS letters* 588(24):4527-4535.
62. Zhang X, *et al.* (2015) miR-874 functions as a tumor suppressor by inhibiting angiogenesis through STAT3/VEGF-A pathway in gastric cancer. *Oncotarget* 6(3):1605-1617.
63. Izzotti A, *et al.* (2014) Modulation by metformin of molecular and histopathological alterations in the lung of cigarette smoke-exposed mice. *Cancer Medicine* 3(3):719-730.
64. Blandino G, *et al.* (2012) Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nature communications* 3:865.
65. Corcoran RB, *et al.* (2011) STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer research* 71(14):5020-5029.
66. Deschenes-Simard X, *et al.* (2013) Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes & development* 27(8):900-915.
67. Moiseeva O, *et al.* (2013) Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappaB activation. *Aging cell* 12(3):489-498.

Figures and legends

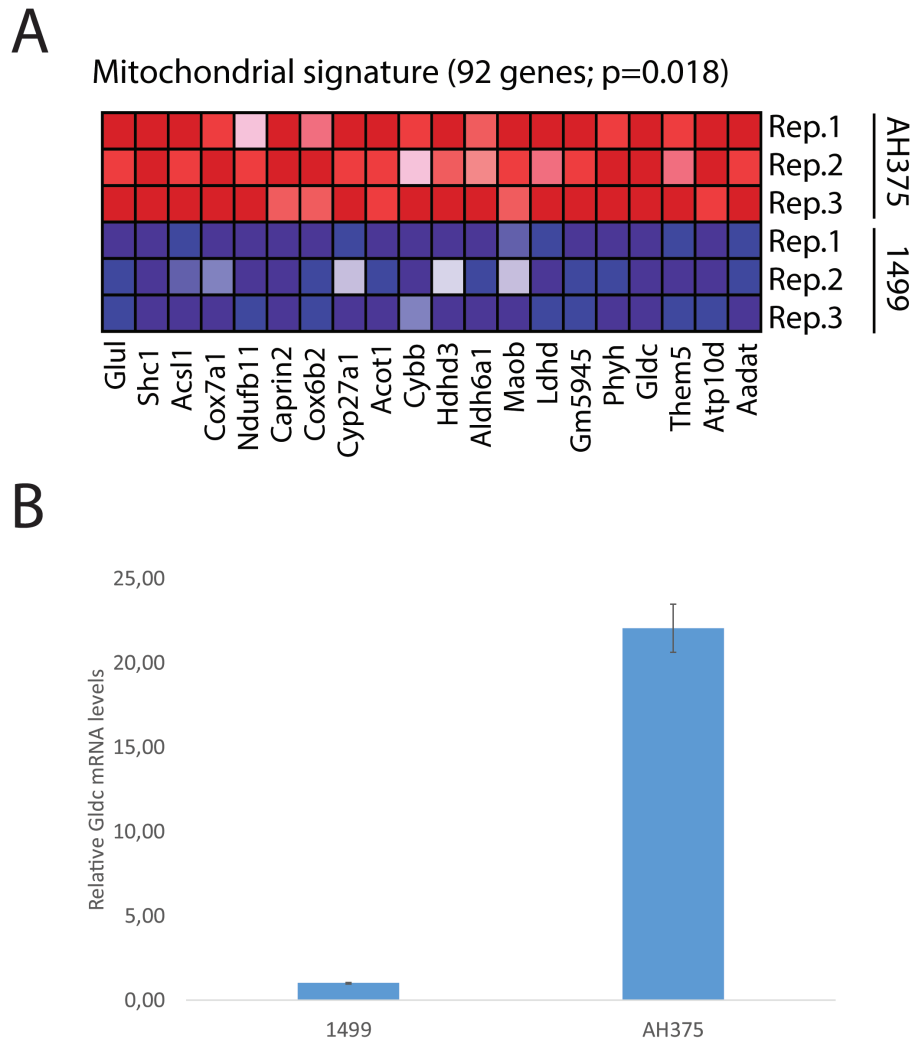


Figure 1. **Glycine decarboxylase is overexpressed in PDAC cells compared to PanIN.**

(A) Microarray comparing gene expression of PDAC cell line AH375 to PanIN cell line 1499 reveals a mitochondrial signature. Glycine decarboxylase (Gldc) is overexpressed in AH375 cells. List of gene names can be found in Supplementary Table I.

(B) RT-qPCR validation of microarray data.

Error bars represent mean \pm SD.

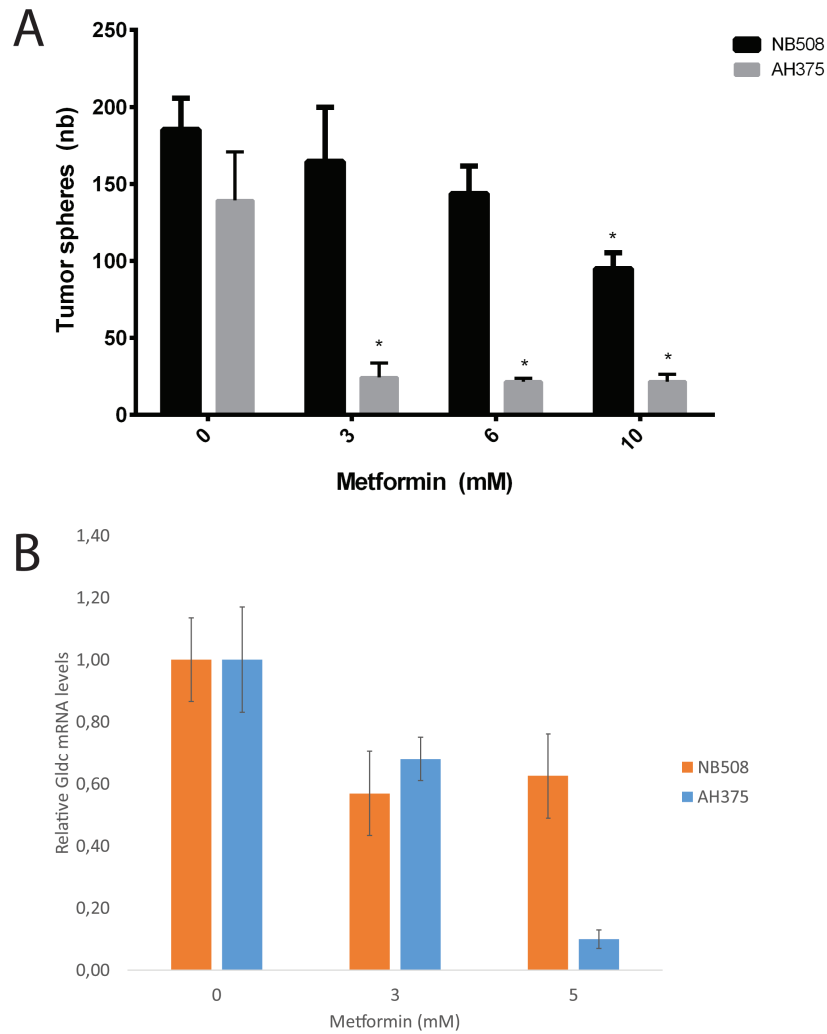


Figure 2. Metformin treatment reduces tumor sphere formation and glycine decarboxylase mRNA levels.

(A) Tumor sphere assay on NB508 and AH375 cells treated with indicated doses of metformin for 10 days.

(B) RT-qPCR on Gldc in AH375 and NB508 cells treated with indicated doses of metformin for 5 days.

Error bars indicate mean \pm SD. * : $p < 0.05$

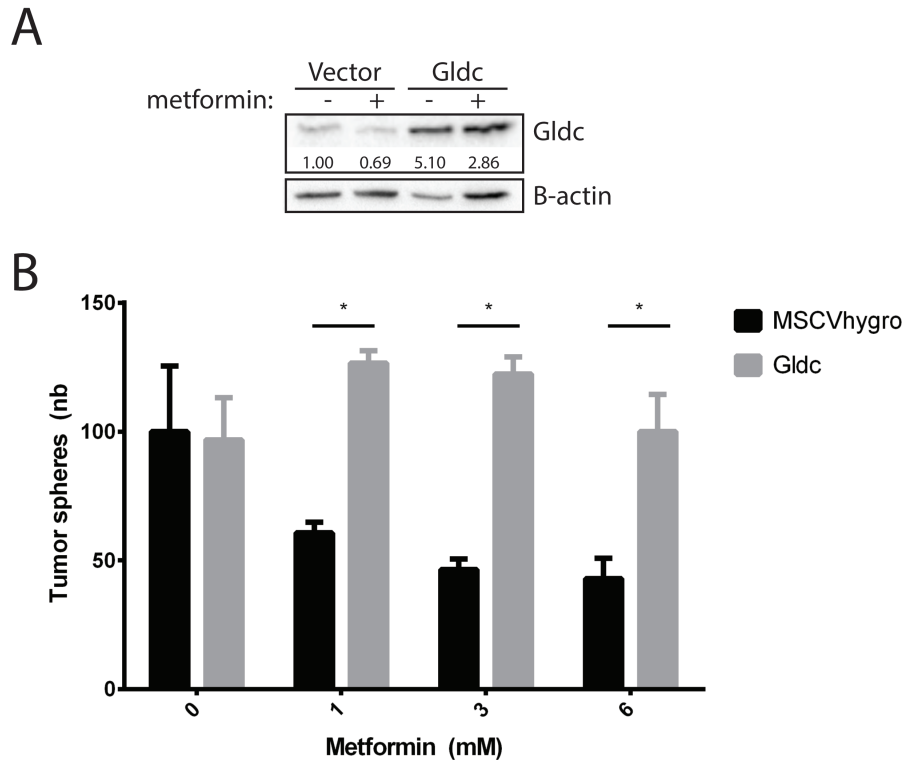


Figure 3. Glycine decarboxylase overexpression reduces metformin sensitivity.

(A) Western blot showing glycine decarboxylase (GLDC) levels in vector or GLDC-overexpressing cells. Quantification done using ImageJ. Indicated values represent relative density of the bands normalized to beta-actin.

(B) Tumor sphere assay on GLDC-overexpressing cells or vector cells treated with indicated doses of metformin.

Error bars indicate mean \pm SD. * : $p < 0.05$

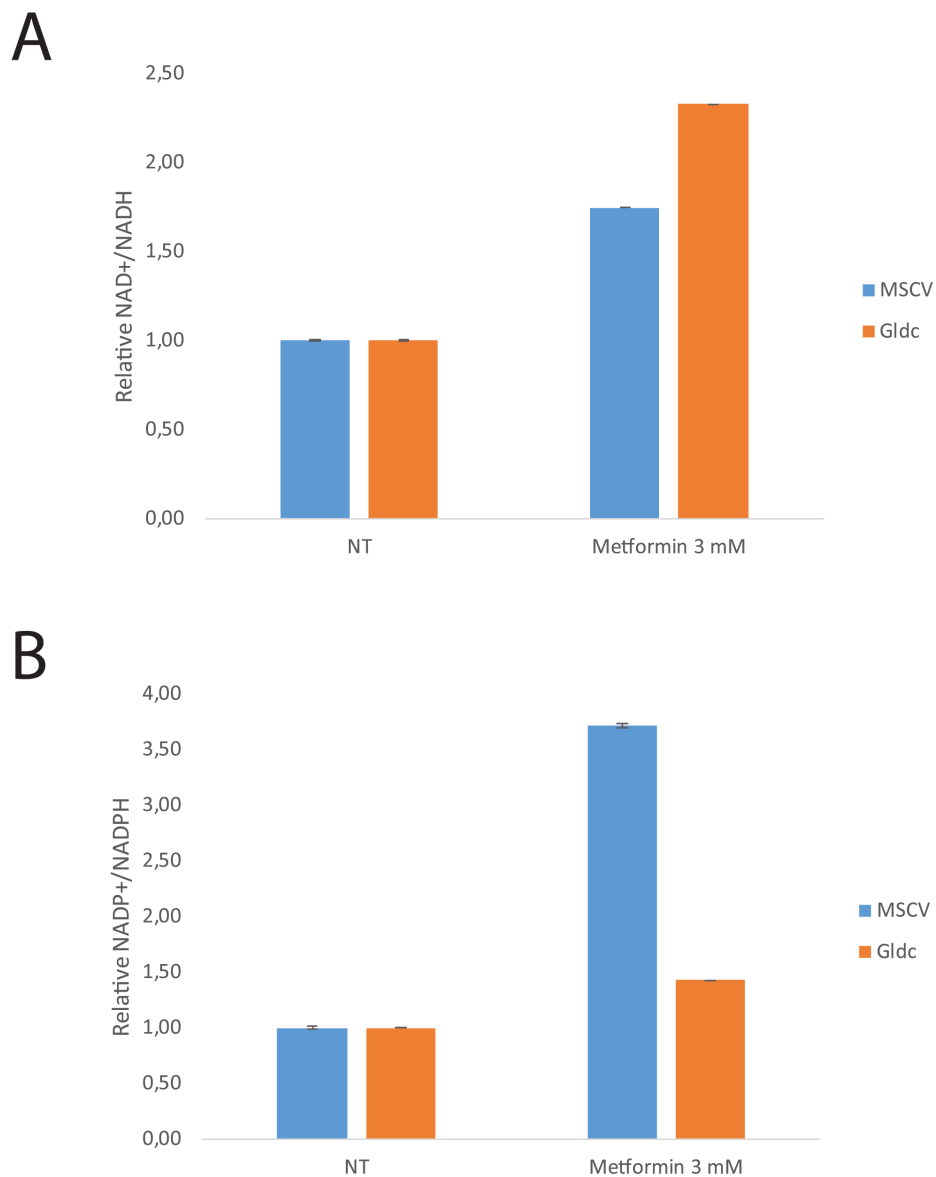


Figure 4. Glycine decarboxylase overexpression restores NADPH levels but not NADH levels under metformin treatment.

Total NAD(P) and NAD(P)H levels were measured with a Biovision enzymatic kit in AH375 cells expressing Glde or an empty vector and treated or not with metformin. NAD^+/NADH (A) and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (B) ratios were subsequently calculated.

Error bars indicate mean \pm SD.

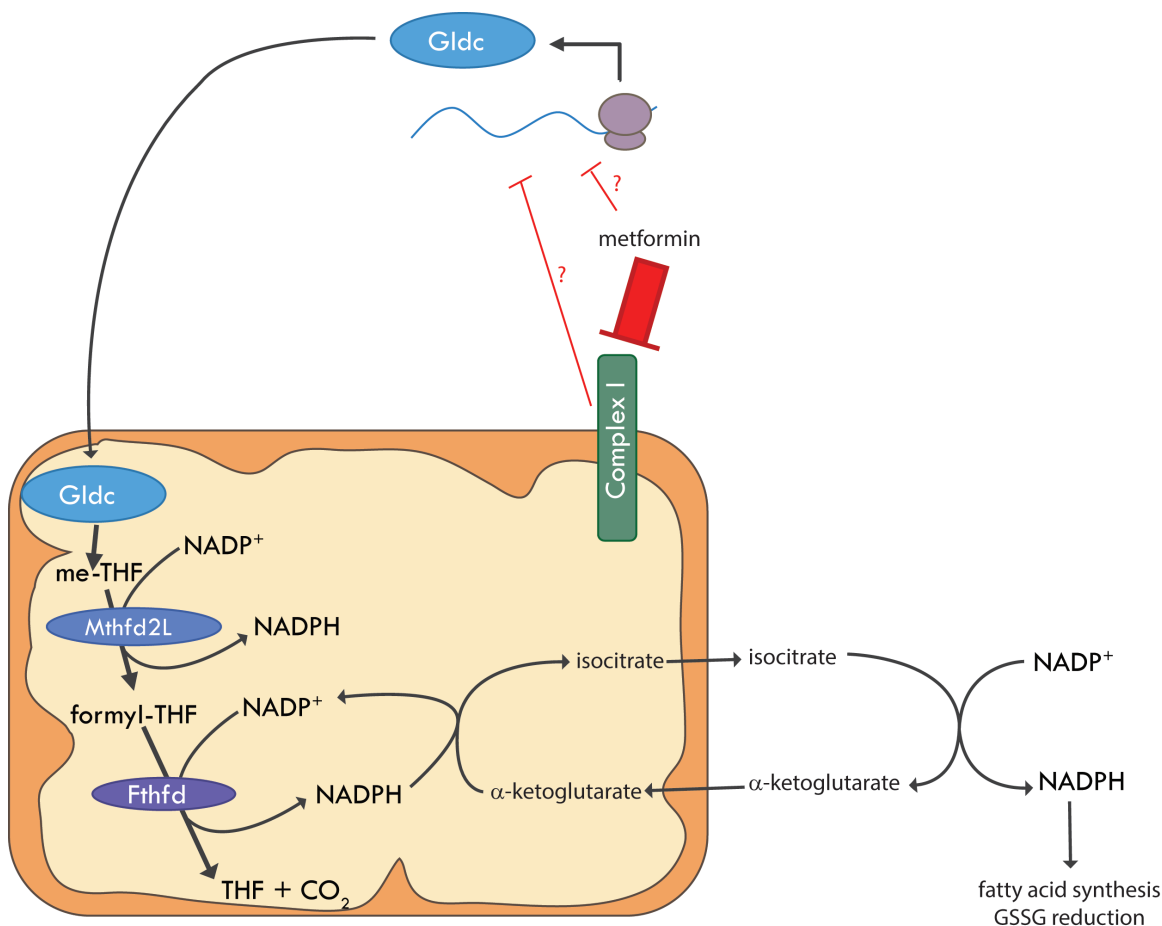


Figure 5. **Schematic of the current working model.**

Metformin treatment inhibits complex I, and this inhibition might trigger signaling that results in decreased Gldc mRNA levels. This decrease in Gldc mRNA levels ultimately results in lower Gldc activity. This decreases flux through one-carbon metabolism in the mitochondria, resulting in lesser NADPH production by Mthfd2L and Fthfd. NADPH produced in the mitochondria can be translocated to the cytosol through the NADPH shuttle. This decrease in NADPH production results in decreased NADPH-dependent fatty acid biosynthesis. This phenotype is reversed by Gldc overexpression.

Gldc: glycine decarboxylase; GSSG: glutathione oxydée; Mthfd2L: methylene-THF dehydrogenase 2L; Fthfd: formyl-THF dehydrogenase; Idh1/2: isocitrate dehydrogenase 1/2.

Supplementary information

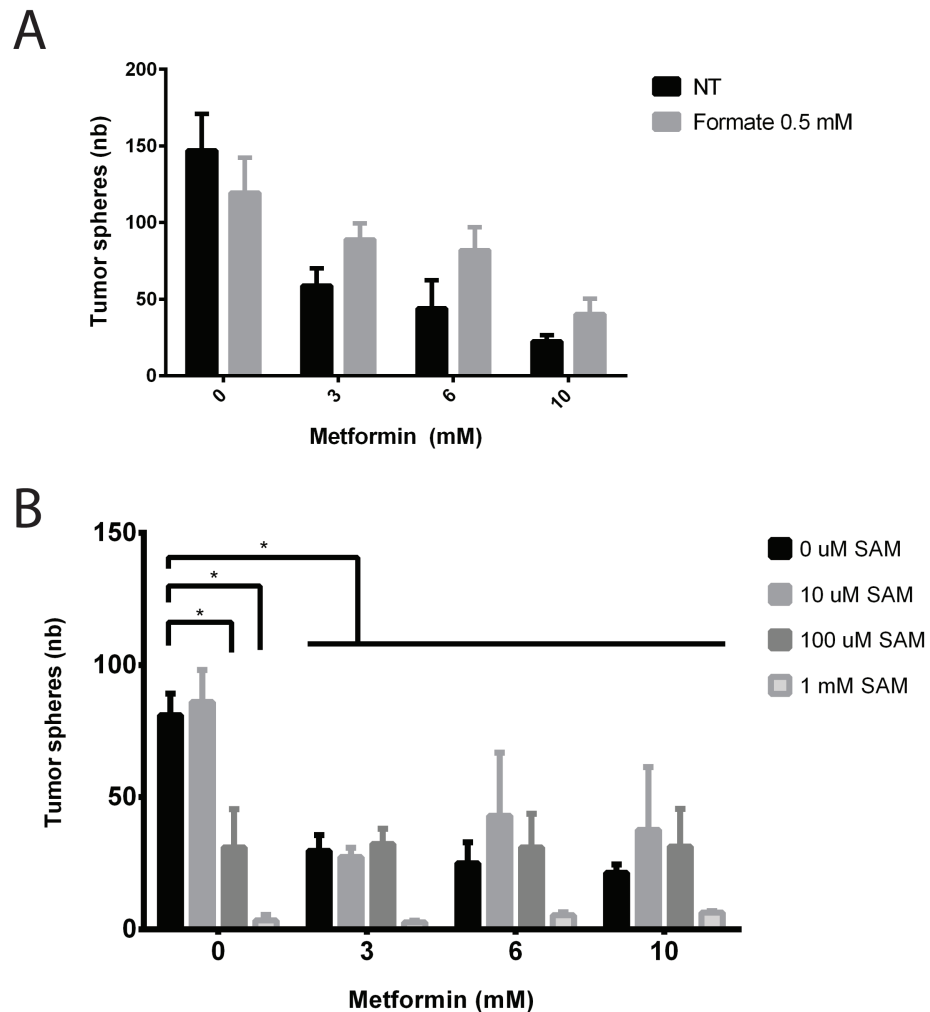


Figure S1. **Carbon units supplementation does not recapitulate metformin desensitization as observed in Glc6-overexpressing cells.**

(A) Tumor sphere assay on AH375 cells treated with indicated doses of metformin and formate. No significant differences were found.

(B) Tumor sphere assay on AH375 cells treated with indicated doses of metformin and S-adenosyl-(L)-methionine (SAM).

Error bars indicate mean \pm SD. * : $p < 0.05$

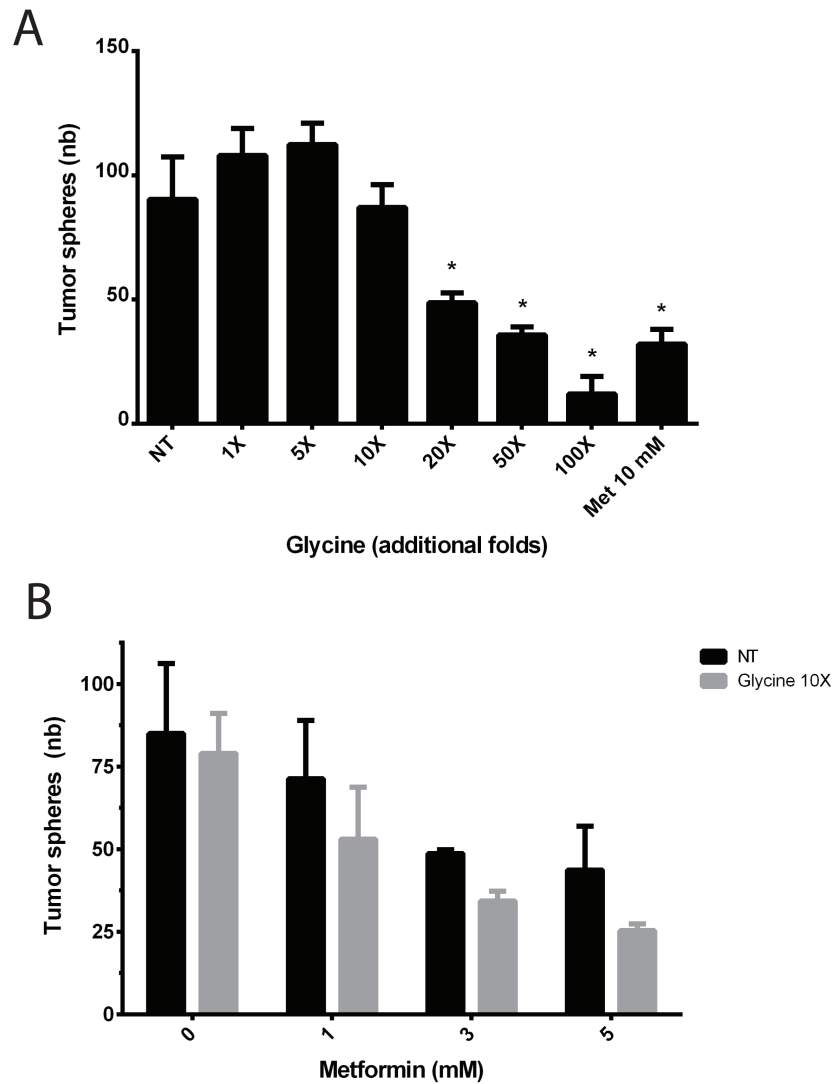


Figure S2. **Metformin sensitivity probably isn't due to glycine accumulation.**

(A) Tumor sphere assay on AH375 cells with indicated doses of glycine (folds compared to normal F12-DMEM medium concentration) or metformin (met).

(B) Tumor sphere assay on AH375 cells treated with indicated doses of glycine and metformin. No significant differences were found.

Error bars indicate mean \pm SD. * : $p < 0.05$

Supplementary Table I. **List of genes found in microarray (fig. 1A)**

Gene symbol	Gene name
Glul	glutamine synthetase
Shc1	src homology 2 domain-containing transforming protein C1
Acs11	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
Cox7a1	cytochrome c oxidase subunit VIIa 1
Ndufb11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11
Caprin2	caprin family member 2
Cox6b2	cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 2
Cyp27a1	cytochrome P450, family 27, subfamily a, polypeptide 1
Acot1	acyl-CoA thioesterase 1
Cybb	cytochrome b-245, beta polypeptide
Hdhd3	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 3
Aldh6a1	aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1
Maob	monoamine oxidase B
Ldhd	lactate dehydrogenase D
Gm5945	predicted gene 5945
Phyh	phytanoyl-CoA hydroxylase
Glde	glycine decarboxylase
Them5	thioesterase superfamily member 5
Atp10d	ATPase, class V, type 10D
Aadat	aminoadipate aminotransferase

Discussion

La metformine et les cellules initiatrices de tumeur

Il a été démontré, par nous et par d'autres (44-46, 109, 110), que la metformine ciblait les cellules initiatrices de tumeur, et ce, dans plusieurs types de cancers. L'implication est que la metformine devrait être une thérapie efficace pour tous les cancers contenant des TICs. Par contre, nous avons observé en fig. 2A (p. 49) une différence dans la sensibilité à la metformine des TICs des lignées de cancer pancréatique NB508 vs AH375. D'autres groupes ont également observé des sensibilités variées à la metformine de TICs provenant de différentes lignées cellulaires mais d'un même type de cancer (45, 46). Par contre, puisque le mécanisme par lequel la metformine affecte les TICs n'est pas encore clair, les éléments déterminant la sensibilité des diverses lignées à la metformine ne sont pas connus. Nos résultats laissent croire que l'importance relative des voies pentose phosphate versus le métabolisme du carbone pour la génération de NADPH pourrait être un déterminant de la sensibilité des TICs à la metformine. Si c'est le cas, la metformine serait une bonne thérapie pour cibler les TICs de divers cancers, tant qu'elles dépendent assez fortement du métabolisme du carbone pour leur production de NADPH.

Il a été mentionné que le mécanisme par lequel la metformine cible les TICs n'est pas encore bien compris. Par contre, il a été publié que la metformine induit l'apoptose sélective des TICs dans le cancer du pancréas (46). Il serait important de vérifier si nous observons le même phénomène dans nos lignées lors des essais de sphères, en marquant les cellules par du trypan bleu par exemple, afin de mesurer la viabilité cellulaire aux différentes doses de metformine.

Différence dans la sensibilité à la metformine des cellules NB508 vs AH375

En figure 2A (p. 49), il est démontré que le traitement avec 3 mM metformine diminue fortement la formation de sphères chez les cellules AH375 mais peu chez les NB508. Paradoxalement, les niveaux d'ARNm de Glc6P mesurés dans les deux lignées traitées avec 3 mM metformine sont similaires (fig. 2B, p. 49). Ce résultat peut à première vue sembler aller

à l'encontre de l'hypothèse proposant que la diminution de la formation de sphères sous metformine est due à une diminution de l'expression de Gluc. Toutefois, il est important de comprendre que ces expériences ne sont pas réalisées dans les mêmes conditions. En effet, étant donné la difficulté d'obtenir des quantités importantes de matériel ARN lorsque les cellules sont cultivées en sphères tumorales, nous avons utilisé des cellules cultivées en adhérence pour mesurer les niveaux d'ARNm de Gluc sous traitement metformine. La population cellulaire poussant en adhérence n'est pas identique à celle poussant en sphères : elle contient en proportion beaucoup moins de cellules initiatrices de tumeur. Il faut donc être conscient que les niveaux d'ARNm de Gluc sous traitement metformine présentés en fig. 2B (p. 49) ne reflètent pas nécessairement les niveaux d'ARNm de Gluc dans les TICs de ces deux lignées sous traitement metformine. Il est possible que, bien que la metformine ait un effet similaire sur les niveaux d'ARNm de Gluc dans la population adhérente des deux lignées, elle ait un effet beaucoup plus marqué sur les niveaux d'ARNm de Gluc dans les TICs de la lignée AH375. Ceci pourrait être dû à la présence de vulnérabilités métaboliques différentes dans cette lignée comparativement aux NB508 – par exemple, une dépendance accrue au métabolisme du carbone comparativement à la voie pentose phosphate pour la synthèse de NADPH – pour des raisons que nous n'avons pas encore élucidées. Les niveaux d'ARNm de Gluc devraient être mesurés sur les cellules AH375 et NB508 cultivées en sphères sous traitement metformine, afin de clarifier la question.

Importance de l'accumulation de la glycine

Le fait que la diminution de l'activité Gluc devrait entraîner une augmentation de la glycine intracellulaire, combiné au résultat présenté en fig. S2A (p.53) de l'article qui démontre que l'excès de glycine peut diminuer la formation de sphères tumorales, porte à croire que l'accumulation de la glycine pourrait jouer un rôle dans les phénomènes observés ici. En effet, l'accumulation de glycine pourrait favoriser l'inversion du flux du métabolisme du carbone dans la mitochondrie, résultant en une diminution de la formation de NADPH, comme cela a déjà été démontré (85). Nous n'avons cependant pas été capables de démontrer un effet additif de la glycine et de la metformine (fig. S2B, p.53). Cela est peut-être dû au fait que l'absorption de la glycine se fait par des transporteurs, et que donc la cellule peut contrôler la quantité de glycine

entrante et limiter ainsi l'excès de glycine intracellulaire. En effet, seulement 35% de la glycine dans un milieu DMEM contenant 0.4 mM de glycine est absorbée (85). Il aurait été intéressant de tester l'additivité des traitements glycine et metformine en utilisant de la glycine estérifiée, capable de traverser les membranes cellulaires (108), afin de clarifier cela. De plus, une quantification de la glycine intracellulaire aurait pu être effectuée par GC-MS ou RMN dans les cellules AH375 vecteur ou Glc6 traitées ou non à la metformine, afin de voir si la metformine induisait dans les cellules vecteur une accumulation de glycine qui était absente dans les cellules Glc6.

Importance du NADPH dans la sensibilité à la metformine

Les résultats présentés ici suggèrent que la diminution de NADPH est un élément important de l'inhibition de la formation de sphères tumorales par la metformine, puisque lorsque la metformine bloque la formation de sphères le NADPH diminue, et lorsqu'elle ne la bloque pas (dans les cellules Glc6) le NADPH ne diminue pas (fig. 4B, p.50). Toutefois, ceci est une observation corrélative et non une preuve de causalité. Il sera nécessaire de tester si l'extinction par shARN de l'expression de Glc6 module le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ de la même manière que le traitement metformine.

Si c'est effectivement la production de NADPH qui est importante pour désensibiliser à la metformine, alors la surexpression de Mthfd2L ou de Mthfd1 devrait avoir le même effet sur la formation de sphères que la surexpression de Glc6. Si le NADPH est principalement important pour restaurer la synthèse des acides gras, (qui a précédemment été proposée comme une cible de la metformine (61, 63)), alors il est principalement utilisé dans le cytosol. Cela implique que le NADPH produit dans la mitochondrie doit être transféré au cytosol par le système de transport du NADPH. Par conséquent, le *knockdown* de composantes du système de transport du NADPH, comme Idh1/2, devrait restaurer la sensibilité à la metformine dans les cellules surexprimant Glc6 ou Mthfd2L, mais pas dans les cellules surexprimant Mthfd1. Des études métaboliques mesurant la présence des acides gras en élongation devraient montrer que la metformine diminue la synthèse des acides gras dans les cellules vecteur, mais pas dans les cellules surexprimant Glc6, Mthfd2L ou Mthfd1.

Importance du NADPH pour les cellules cancéreuses

Pour les cellules cancéreuses, le NADPH sert principalement à la synthèse des acides gras et à la protection contre les ROS (76, 83, 93, 100). Puisque la metformine diminue la production de ROS (60), il est peu probable que ce soit cet aspect dépendant du NADPH qui soit important pour la diminution de la formation de sphères tumorales; les résultats nous laissent donc supposer que ce serait plutôt la synthèse des acides gras qui serait en cause. Il aurait été possible de tester cette hypothèse en mesurant la synthèse de lipides chez les cellules AH375 surexprimant ou non Gluc et traitées ou non à la metformine. La synthèse de lipides aurait pu être mesurée par métabolomique pour quantifier précisément les précurseurs et les différents types de lipides. Puisque le NADPH permet la conversion du 3-cétoacyl-ACP en 3-hydroxyacyl-ACP, et celle du *trans*-2-énoyl-ACP en acyl-ACP (96), la déplétion de NADPH induite par la metformine devrait logiquement entraîner une accumulation de 3-cétoacyl-ACP, et peut-être aussi de *trans*-2-énoyl-ACP. La synthèse des lipides aurait pu aussi être mesurée par coloration *oil red O*, un colorant liposoluble marquant les lipides et permettant de les quantifier visuellement entre les différentes conditions (111). Le désavantage de cette technique est qu'elle mesure la présence de lipides de manière très générale, et ne permet pas d'observer l'accumulation ou non de certains précurseurs spécifiques.

Régulation de la production de NADPH par p53

Comme discuté dans l'article, il a été démontré que p53 pouvait réguler la production de NADPH par G6PD et ME1/2 (101, 105). Nos résultats ne nous permettent malheureusement pas de conclure de manière décisive sur le rôle de p53 sur la production de NADPH dans notre modèle. Pour ce faire, il aurait fallu mesurer le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ dans les NB508 traitées à la metformine comparativement aux AH375 traitées metformine, pour voir si l'effet de la metformine sur le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ était moindre sur les NB508 que sur les AH375. Il aurait fallu également vérifier le statut de p53 dans les AH375 par séquençage génomique. En effet, même si la souris à partir de laquelle cette lignée a été établie était $\text{p53}^{+/+}$, il est très possible que l'expression ou la fonction de p53 ait été perdue lors de la progression vers le PDAC (112), et que p53 ne puisse donc pas affecter la production de G6pd ou Me1/2 dans notre modèle.

Régulation transcriptionnelle de Gldc par la metformine

Une question à laquelle ce projet n'apporte pas encore de réponse est celle du mécanisme permettant la régulation des niveaux d'ARNm de Gldc par la metformine. Cette régulation pourrait se faire de deux façons, par répression transcriptionnelle ou par miARN(s).

L'hypothèse de la répression transcriptionnelle propose que la metformine, soit par son inhibition du complexe I ou par un autre mécanisme, induise une signalisation cellulaire résultant en l'activation de répresseur(s) transcriptionnel(s) ciblant, entre autres, Gldc, ce qui expliquerait les niveaux d'ARNm réduits observés. Il a été démontré que l'activation d'AMPK pouvait induire la liaison des récepteurs reliés à l'œstrogène α et γ (ERR α/γ) et de leurs coactivateurs PGC-1 α/β à plusieurs gènes du métabolisme du folate, et ce, d'une manière réprimant la transcription (113), expliquant possiblement l'effet de la metformine sur Gldc observé ici. Cela pourrait être validé en testant si des shARNs contre AMPK, ERR ou PGC-1 permettraient de désensibiliser les cellules à la metformine d'une manière similaire à la surexpression de Gldc. Plus largement, l'hypothèse de la régulation transcriptionnelle de Gldc par la metformine pourrait être testée par l'utilisation d'un rapporteur luciférase contenant le promoteur de Gldc. Si l'activité luciférase du rapporteur diminue dans les cellules AH375 traitées ou non à la metformine, alors l'hypothèse de la régulation transcriptionnelle est probablement correcte. Si par contre ce n'est pas le cas, cela laisse supposer que la diminution de l'ARNm Gldc est plutôt due à une régulation post-transcriptionnelle.

Il est possible que la diminution des niveaux d'ARNm de Gldc soit due à une augmentation induite par la metformine de l'activité de miARN(s) la ciblant. Il a été mentionné dans l'article que la famille miR-30, de même que miR-874 ont des sites potentiels dans l'ARNm Gldc, tel que déterminé par l'outil DIANA (114, 115). Ces miARNs sont des suppresseurs de tumeur dont l'expression est diminuée dans le cancer (116-126) et augmentée par le traitement metformine (127, 128), ce qui en fait de possibles candidats pour cette régulation. Cette hypothèse pourrait être testée d'abord en mesurant par RT-qPCR les niveaux de ces miARNs dans les cellules AH375 surexprimant ou non Gldc et traitées ou non à la metformine. Normalement, les niveaux de ces miARNs devraient augmenter dans les deux conditions de traitement metformine. La validation du ciblage de Gldc par ces miARNs pourrait

se faire en les surexprimant et en mesurant ensuite par RT-qPCR les niveaux d'ARNm de Gldc. Cela pourrait aussi être testé par essai de rapporteur luciférase, en utilisant un rapporteur contenant le 3'UTR de Gldc (129). L'élimination de ces miARNs par CRISPR ou par l'utilisation d'éponge à miARNs devrait diminuer la sensibilité à la metformine d'une manière similaire à ce qui a été observé pour la surexpression de Gldc. Inversement, la surexpression de ces miARNs devrait récapituler l'effet de la metformine sur la formation de sphères tumorales et le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Par contre, notons que ces miARNs n'ont pas de sites potentiels dans Mthfd1/2L, ce qui n'irait pas dans le sens d'une régulation plus globale du métabolisme du carbone par la metformine.

Régulation des niveaux protéiques de Gldc et de son activité enzymatique par la metformine

Notons qu'il reste à mesurer la régulation des niveaux protéiques de Gldc par la metformine, ainsi que l'impact de cette régulation sur son activité enzymatique. En effet, il est possible qu'en situation normale la quantité totale de Gldc présente dans la cellule soit supérieure à l'activité enzymatique de Gldc utilisée. Dans ce cas, une diminution de l'expression de Gldc ne représenterait pas nécessairement une diminution de la réaction catalysée par Gldc. L'immunobuvardage de la fig. 3A (p. 50) montre une diminution des niveaux endogènes de Gldc sous traitement metformine dans les cellules vecteur, ce qui laisse croire que la diminution des niveaux d'ARNm se traduit effectivement par une baisse des niveaux protéiques. Il serait important de tester l'impact de cette diminution des niveaux de Gldc sur l'activité enzymatique du système de clivage de la glycine. Ceci pourrait être fait en mesurant la libération du carbone marqué de la $[1-^{14}\text{C}]$ glycine sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ (130) dans les cellules 1499 et AH375 traitées avec différentes doses de metformine.

GLDC, hypoxie et metformine

La metformine induit une inhibition de la chaîne respiratoire en bloquant le complexe I (57), ce qui entraîne une diminution de la capacité de la cellule à utiliser la phosphorylation oxydative pour générer de l'énergie, et donc la nécessité pour la cellule de reprogrammer son métabolisme vers un métabolisme glycolytique – l'incapacité à effectuer ce changement

métabolique entraînant la mort cellulaire (79). On peut donc supposer que les cellules possédant une meilleure capacité à fonctionner en hypoxie totale ou partielle résisteront mieux à la metformine, ayant déjà un métabolisme plutôt glycolytique qu'oxydatif. Sachant que la surexpression de GLDC confère un avantage de survie considérable aux cellules tumorales en situation d'hypoxie (108), il n'est donc pas étonnant que la surexpression de GLDC confère aussi la résistance à la metformine observée ici.

Perspectives

Les résultats de cette étude suggèrent que l'augmentation du ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ serait importante pour la sensibilité des TICs à la metformine. Ainsi, il est envisageable de concevoir des traitements bloquant la production de NADPH afin de cibler les TICs. Plus précisément, les enzymes du métabolisme du carbone directement impliquées dans la production de NADPH, c'est-à-dire MTHFD1/2L, pourraient être envisagées comme cibles thérapeutiques. Puisqu'il a été démontré que GLDC était cruciale aux TICs (107), et que nous démontrons ici que la surexpression de GLDC permet de restaurer les niveaux de NADPH sous traitement metformine, il serait également envisageable de cibler à la fois MTHFD1/2L et GLDC. Une autre avenue thérapeutique possible serait de cibler non pas les enzymes productrices de NADPH directement, mais la navette permettant de transporter les équivalents de NADPH de la mitochondrie au cytosol. Par contre, le ciblage du mécanisme de transport du NADPH risque d'être moins spécifique aux TICs, et même aux cellules cancéreuses en général, comparativement aux cellules normales, puisque ces enzymes et transporteurs sont exprimés dans les cellules saines aussi, tandis que GLDC, par exemple, est fortement surexprimée dans les cellules transformées dédifférenciées, mais pas dans les cellules transformées différenciées ni dans les cellules normales (108), ce qui en ferait une cible plus spécifique.

Conclusion

Ce projet a démontré que la glycine décarboxylase était fortement surexprimée dans les cellules malignes de PDAC comparativement à des cellules bénignes de PanIN, et que cette enzyme était un déterminant important de la sensibilité à la metformine, puisque le traitement à la metformine diminue son expression, et que sa surexpression diminue la réponse à la metformine. Nous n'avons pas pu démontrer le mécanisme direct expliquant cette désensibilisation à la metformine par la Gldc, mais nous démontrons que la surexpression de Gldc restaure les niveaux de NADPH, qui sont fortement diminués sous traitement metformine, permettant potentiellement la reprise de la synthèse des acides gras et donc de la prolifération cellulaire. Nous proposons donc un modèle dans lequel la metformine induit, par un mécanisme encore inconnu, une forte augmentation du ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, ce qui bloque la protection contre les ROS, mais surtout la synthèse des acides gras, ce qui nuit à la prolifération des cellules initiatrices de tumeur. Ces résultats ouvrent la porte à une nouvelle compréhension du mécanisme d'action de la metformine, et nous permettront éventuellement de concevoir des drogues plus efficaces ciblant spécifiquement les cellules initiatrices de tumeur.

Bibliographie

1. Anonymous (2015) SEER Stat Fact Sheets: Pancreas Cancer. in *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program: Turning Cancer Data Into Discovery*, ed Institute NC (National Institute of Health).
2. Carpelan-Holmstrom M, *et al.* (2005) Does anyone survive pancreatic ductal adenocarcinoma? A nationwide study re-evaluating the data of the Finnish Cancer Registry. *Gut* 54(3):385-387.
3. Gungor C, Hofmann BT, Wolters-Eisfeld G, & Bockhorn M (2014) Pancreatic cancer. *Br J Pharmacol* 171(4):849-858.
4. Fitzgerald TL & McCubrey JA (2014) Pancreatic cancer stem cells: Association with cell surface markers, prognosis, resistance, metastasis and treatment. *Advances in biological regulation* 56:45-50.
5. Schmid RM (2002) Acinar-to-ductal metaplasia in pancreatic cancer development. *The Journal of clinical investigation* 109(11):1403-1404.
6. Bryant KL, Mancias JD, Kimmelman AC, & Der CJ (2014) KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in biochemical sciences* 39(2):91-100.
7. Fernández-Medarde A & Santos E (2011) Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes & Cancer* 2(3):344-358.
8. Del Chiaro M, Segersvard R, Lohr M, & Verbeke C (2014) Early detection and prevention of pancreatic cancer: is it really possible today? *World journal of gastroenterology : WJG* 20(34):12118-12131.
9. Morris JPt, Wang SC, & Hebrok M (2010) KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature reviews. Cancer* 10(10):683-695.
10. Florio T & Barbieri F (2012) The status of the art of human malignant glioma management: the promising role of targeting tumor-initiating cells. *Drug discovery today* 17(19-20):1103-1110.
11. Bonnet D & Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3(7):730-737.
12. Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, & Clarke MF (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Current opinion in genetics & development* 14(1):43-47.
13. Beck B & Blanpain C (2013) Unravelling cancer stem cell potential. *Nature reviews. Cancer* 13(10):727-738.
14. Clevers H (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine* 17(3):313-319.
15. Galmozzi E, Facchetti F, & La Porta CA (2006) Cancer stem cells and therapeutic perspectives. *Current medicinal chemistry* 13(6):603-607.
16. Hadjipanayis CG & Van Meir EG (2009) Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 87(4):363-374.
17. O'Connor ML, *et al.* (2014) Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer letters* 344(2):180-187.

18. Singh SK, *et al.* (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* 63(18):5821-5828.
19. Takahashi R-u, Takeshita F, Fujiwara T, Ono M, & Ochiya T (2011) Cancer Stem Cells in Breast Cancer. *Cancers* 3(1):1311-1328.
20. Tanase CP, *et al.* (2014) Cancer stem cells: Involvement in pancreatic cancer pathogenesis and perspectives on cancer therapeutics. *World journal of gastroenterology : WJG* 20(31):10790-10801.
21. Tysnes BB (2010) Tumor-initiating and -propagating cells: cells that we would like to identify and control. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 12(7):506-515.
22. Valent P, *et al.* (2012) Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature reviews. Cancer* 12(11):767-775.
23. Abdullah LN & Chow EK (2013) Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and translational medicine* 2(1):3.
24. Baumann M, Krause M, & Hill R (2008) Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nature reviews. Cancer* 8(7):545-554.
25. Fulda S (2013) Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer letters* 338(1):168-173.
26. Chiu PP, Jiang H, & Dick JE (2010) Leukemia-initiating cells in human T-lymphoblastic leukemia exhibit glucocorticoid resistance. *Blood* 116(24):5268-5279.
27. Li X, *et al.* (2008) Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 100(9):672-679.
28. Viale A, *et al.* (2014) Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* 514(7524):628-632.
29. Pastrana E, Silva-Vargas V, & Doetsch F (2011) Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell stem cell* 8(5):486-498.
30. Han ME, *et al.* (2011) Cancer spheres from gastric cancer patients provide an ideal model system for cancer stem cell research. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68(21):3589-3605.
31. Hirschhaeuser F, *et al.* (2010) Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology* 148(1):3-15.
32. Wang YJ, Bailey JM, Rovira M, & Leach SD (2013) Sphere-forming assays for assessment of benign and malignant pancreatic stem cells. *Methods in molecular biology* 980:281-290.
33. Gou S, *et al.* (2007) Establishment of clonal colony-forming assay for propagation of pancreatic cancer cells with stem cell properties. *Pancreas* 34(4):429-435.
34. Kim MP, *et al.* (2011) ALDH activity selectively defines an enhanced tumor-initiating cell population relative to CD133 expression in human pancreatic adenocarcinoma. *PloS one* 6(6):e20636.
35. Miranda-Lorenzo I, *et al.* (2014) Intracellular autofluorescence: a biomarker for epithelial cancer stem cells. *Nature methods* 11(11):1161-1169.
36. Quintana E, *et al.* (2008) Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456(7222):593-598.
37. Shen Y-A, Wang C-Y, Hsieh Y-T, Chen Y-J, & Wei Y-H (2014) Metabolic reprogramming orchestrates cancer stem cell properties in nasopharyngeal carcinoma. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 14(1):86-98.

38. Jang H, Yang J, Lee E, & Cheong JH (2015) Metabolism in embryonic and cancer stemness. *Arch Pharm Res* 38(3):381-388.
39. Vlashi E, *et al.* (2011) Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(38):16062-16067.
40. Vlashi E, *et al.* (2009) In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *Journal of the National Cancer Institute* 101(5):350-359.
41. Chen K, Huang Y-h, & Chen J-l (2013) Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 34(6):732-740.
42. Khdair A, *et al.* (2010) Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 141(2):137-144.
43. Wellberg EA & Anderson SM (2014) FASNating Targets of Metformin in Breast Cancer Stem-Like Cells. *Hormones & cancer*.
44. Hirsch HA, Iliopoulos D, & Struhl K (2013) Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(3):972-977.
45. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tschlis PN, & Struhl K (2009) Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer research* 69(19):7507-7511.
46. Lonardo E, *et al.* (2013) Metformin targets the metabolic achilles heel of human pancreatic cancer stem cells. *PloS one* 8(10):e76518.
47. Rena G, Pearson ER, & Sakamoto K (2013) Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia* 56(9):1898-1906.
48. Graham GG, *et al.* (2011) Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical pharmacokinetics* 50(2):81-98.
49. Chong CR & Chabner BA (2009) Mysterious Metformin. *The Oncologist* 14(12):1178-1181.
50. Luft D, Schmulling RM, & Eggstein M (1978) Lactic acidosis in biguanide-treated diabetics: a review of 330 cases. *Diabetologia* 14(2):75-87.
51. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, & Viollet B (2014) Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell metabolism* 20(6):953-966.
52. Prochilo T, *et al.* (2014) Blind Snipers: Relevant Off Target Effects of Non-Chemotherapeutic Agents in Oncology. Review of the Literature. *Reviews on recent clinical trials*.
53. Viollet B, *et al.* (2012) Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science (London, England : 1979)* 122(6):253-270.
54. Andrzejewski S, Gravel SP, Pollak M, & St-Pierre J (2014) Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & metabolism* 2:12.
55. Batandier C, *et al.* (2006) The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr* 38(1):33-42.
56. Matsuzaki S & Humphries KM (2015) Selective inhibition of deactivated mitochondrial complex I by biguanides. *Biochemistry* 54(11):2011-2021.

57. Owen MR, Doran E, & Halestrap AP (2000) Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal* 348 Pt 3:607-614.
58. Madiraju AK, *et al.* (2014) Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510(7506):542-546.
59. Bridges HR, Jones AJ, Pollak MN, & Hirst J (2014) Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *The Biochemical journal* 462(3):475-487.
60. Moiseeva O, *et al.* (2013) Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappaB activation. *Aging cell* 12(3):489-498.
61. Cantoria MJ, Boros LG, & Meuillet EJ (2014) Contextual inhibition of fatty acid synthesis by metformin involves glucose-derived acetyl-CoA and cholesterol in pancreatic tumor cells. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* 10:91-104.
62. Ford RJ, *et al.* (2015) Metformin and salicylate synergistically activate liver AMPK, inhibit lipogenesis and improve insulin sensitivity. *The Biochemical journal* 468(1):125-132.
63. Loubiere C, *et al.* (2015) Metformin-induced energy deficiency leads to the inhibition of lipogenesis in prostate cancer cells. *Oncotarget*.
64. O'Brien AJ, *et al.* (2015) Salicylate activates AMPK and synergizes with metformin to reduce the survival of prostate and lung cancer cells ex vivo through inhibition of de novo lipogenesis. *The Biochemical journal*.
65. Aatsinki S-M, *et al.* (2014) Metformin induces PGC-1 α expression and selectively affects hepatic PGC-1 α functions. *British Journal of Pharmacology* 171(9):2351-2363.
66. Caton PW, *et al.* (2010) Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis through induction of SIRT1 and GCN5. *The Journal of endocrinology* 205(1):97-106.
67. Suwa M, Egashira T, Nakano H, Sasaki H, & Kumagai S (2006) *Metformin increases the PGC-1 α protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo* pp 1685-1692.
68. Corominas-Faja B, *et al.* (2012) Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism in a manner similar to the antifolate class of chemotherapy drugs. *Aging* 4(7):480-498.
69. Sahin M, Tutuncu NB, Ertugrul D, Tanaci N, & Guvener ND (2007) Effects of metformin or rosiglitazone on serum concentrations of homocysteine, folate, and vitamin B12 in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes and its complications* 21(2):118-123.
70. Schalinske KL & Smazal AL (2012) Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Advances in nutrition* 3(6):755-762.
71. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, & Morris AD (2005) Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ (Clinical research ed.)* 330(7503):1304-1305.
72. Landman GWD, *et al.* (2010) Metformin Associated With Lower Cancer Mortality in Type 2 Diabetes: ZODIAC-16. *Diabetes Care* 33(2):322-326.
73. Decensi A, *et al.* (2010) Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 3(11):1451-1461.

74. Kordes S, *et al.* (Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 16(7):839-847.
75. Bonini MG & Gantner BN (2013) The multifaceted activities of AMPK in tumor progression--why the "one size fits all" definition does not fit at all? *IUBMB Life* 65(11):889-896.
76. Jeon SM, Chandel NS, & Hay N (2012) AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* 485(7400):661-665.
77. Vincent EE, *et al.* (2014) Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism. *Oncogene*.
78. Caton PW, Kieswich J, Yaqoob MM, Holness MJ, & Sugden MC (2011) Metformin opposes impaired AMPK and SIRT1 function and deleterious changes in core clock protein expression in white adipose tissue of genetically-obese db/db mice. *Diabetes, obesity & metabolism* 13(12):1097-1104.
79. Buzzai M, *et al.* (2007) Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer research* 67(14):6745-6752.
80. Hart PC, *et al.* (2015) MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial ROS and AMPK-dependent signalling in cancer. *Nature communications* 6:6053.
81. Janzer A, *et al.* (2014) Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
82. Luka Z, Mudd SH, & Wagner C (2009) Glycine N-Methyltransferase and Regulation of S-Adenosylmethionine Levels. *Journal of Biological Chemistry* 284(34):22507-22511.
83. Locasale JW (2013) Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nature reviews. Cancer* 13(8):572-583.
84. Cabreiro F, *et al.* (2013) Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell* 153(1):228-239.
85. Fan J, *et al.* (2014) Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* 510(7504):298-302.
86. Tibbetts AS & Appling DR (2010) Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annual review of nutrition* 30:57-81.
87. Bolusani S, *et al.* (2011) Mammalian MTHFD2L Encodes a Mitochondrial Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase Isozyme Expressed in Adult Tissues. *The Journal of biological chemistry* 286(7):5166-5174.
88. Nilsson R, *et al.* (2014) Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer. *Nature communications* 5:3128.
89. Alberts B, *et al.* (2002) Catalysis and the Use of Energy by Cells. *Molecular biology of the cell*, (Garland Science, New York), 4th edition Ed.
90. Jackson JB (2003) Proton translocation by transhydrogenase. *FEBS letters* 545(1):18-24.
91. Delabar JM, Martin SR, & Bayley PM (1982) The binding of NADH and NADPH to bovine-liver glutamate dehydrogenase. Spectroscopic characterisation. *European journal of biochemistry / FEBS* 127(2):367-374.
92. Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, & Hiraga K (2008) Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 84(7):246-263.

93. Ying W (2008) NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxidants & redox signaling* 10(2):179-206.
94. Schneider E & Clark DS (2013) Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors. *Biosens Bioelectron* 39(1):1-13.
95. Chan David I & Vogel Hans J (2010) *Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein* pp 1-19.
96. Hiltunen JK, *et al.* (2009) Mitochondrial Fatty Acid Synthesis Type II: More than Just Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry* 284(14):9011-9015.
97. Wallace DC (2012) Mitochondria and cancer. *Nature reviews. Cancer* 12(10):685-698.
98. Hatefi Y & Yamaguchi M (1996) Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a model for utilization of substrate binding energy for proton translocation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10(4):444-452.
99. Hoek JB & Rydstrom J (1988) Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *The Biochemical journal* 254(1):1-10.
100. Patra KC & Hay N (2014) The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in biochemical sciences* 39(8):347-354.
101. Jiang P, Du W, Mancuso A, Wellen KE, & Yang X (2013) Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature* 493(7434):689-693.
102. Rosso L, Marques AC, Reichert AS, & Kaessmann H (2008) Mitochondrial targeting adaptation of the hominoid-specific glutamate dehydrogenase driven by positive Darwinian selection. *PLoS genetics* 4(8):e1000150.
103. MacDonald MJ (1995) Feasibility of a Mitochondrial Pyruvate Malate Shuttle in Pancreatic Islets: FURTHER IMPLICATION OF CYTOSOLIC NADPH IN INSULIN SECRETION. *Journal of Biological Chemistry* 270(34):20051-20058.
104. Tedeschi PM, *et al.* (2013) Contribution of serine, folate and glycine metabolism to the ATP, NADPH and purine requirements of cancer cells. *Cell death & disease* 4:e877.
105. Jiang P, *et al.* (2011) p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature cell biology* 13(3):310-316.
106. Jain M, *et al.* (2012) Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)* 336(6084):1040-1044.
107. Zhang WC, *et al.* (2012) Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell* 148(1-2):259-272.
108. Kim D, *et al.* (2015) SHMT2 drives glioma cell survival in ischaemia but imposes a dependence on glycine clearance. *Nature* 520(7547):363-367.
109. Mohammed A, *et al.* (2013) Antidiabetic Drug Metformin Prevents Progression of Pancreatic Cancer by Targeting in Part Cancer Stem Cells and mTOR Signaling. *Translational oncology* 6(6):649-659.
110. Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, & Struhl K (2011) Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(4):1397-1402.
111. Tseng YH, *et al.* (2008) New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454(7207):1000-1004.

112. Bardeesy N, *et al.* (2006) Both p16Ink4a and the p19Arf-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(15):5947-5952.
113. Audet-Walsh É, Papadopoli D, St-Pierre J, & Giguère V (2014) Abstract 2436: Regulation of breast cancer cell metabolism by the AMPK/ERR/PGC pathway. *Cancer research* 74(19 Supplement):2436.
114. Paraskevopoulou MD, *et al.* (2013) DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic acids research* 41(Web Server issue):W169-173.
115. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, & Hatzigeorgiou AG (2012) Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 28(6):771-776.
116. Braun J, Hoang-Vu C, Dralle H, & Huttelmaier S (2010) Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas. *Oncogene* 29(29):4237-4244.
117. Ouzounova M, *et al.* (2013) MicroRNA miR-30 family regulates non-attachment growth of breast cancer cells. *BMC genomics* 14:139.
118. Ozcan S (2009) MiR-30 family and EMT in human fetal pancreatic islets. *Islets* 1(3):283-285.
119. Zhong Z, Xia Y, Wang P, Liu B, & Chen Y (2014) Low expression of microRNA-30c promotes invasion by inducing epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep* 10(5):2575-2579.
120. Jiang B, *et al.* (2014) miR-874 Inhibits cell proliferation, migration and invasion through targeting aquaporin-3 in gastric cancer. *J Gastroenterol* 49(6):1011-1025.
121. Kesanakurti D, Maddirela DR, Chittivelu S, Rao JS, & Chetty C (2013) Suppression of tumor cell invasiveness and in vivo tumor growth by microRNA-874 in non-small cell lung cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 434(3):627-633.
122. Nohata N, *et al.* (2011) Tumour suppressive microRNA-874 regulates novel cancer networks in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 105(6):833-841.
123. Nohata N, *et al.* (2013) Tumour-suppressive microRNA-874 contributes to cell proliferation through targeting of histone deacetylase 1 in head and neck squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 108(8):1648-1658.
124. Volinia S & Croce CM (2013) Prognostic microRNA/mRNA signature from the integrated analysis of patients with invasive breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(18):7413-7417.
125. Wang L, Gao W, Hu F, Xu Z, & Wang F (2014) MicroRNA-874 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human breast cancer by targeting CDK9. *FEBS letters* 588(24):4527-4535.
126. Zhang X, *et al.* (2015) miR-874 functions as a tumor suppressor by inhibiting angiogenesis through STAT3/VEGF-A pathway in gastric cancer. *Oncotarget* 6(3):1605-1617.
127. Izzotti A, *et al.* (2014) Modulation by metformin of molecular and histopathological alterations in the lung of cigarette smoke-exposed mice. *Cancer Medicine* 3(3):719-730.
128. Blandino G, *et al.* (2012) Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nature communications* 3:865.

129. Sossey-Alaoui K, Bialkowska K, & Plow EF (2009) The miR200 family of microRNAs regulates WAVE3-dependent cancer cell invasion. *The Journal of biological chemistry* 284(48):33019-33029.
130. Steiner JD & Gregory J (2007) Optimized Assay of Glycine Cleavage Activity in Mammalian Cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21(651).